

ESTUDOS CINÉTICOS COM A L-MALATO DESIDROGENASE

MITOCONDRIAL DE CORAÇÃO BOVINO

Adelar Bracht

Tese de Mestrado apresentada
ao Departamento de Bioquímica
da Universidade Federal
do Paraná.

Curitiba
1975

BC/MUFPR - MEMORIA DA UFPR
AUTOR
R\$ 10.00 R\$ 10.00
Termo No. 417/03 Registro:345,517
24/07/2003

ÍNDICE

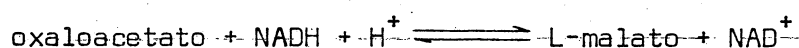
<i>Resumo</i>	2
<i>Introdução</i>	3
<i>Materiais e Metodos</i>	7
Reagentes	7
Purificação da enzima	7
Obtenção dos dados experimentais	8
Tratamento dos dados experimentais	9
Equações de velocidade	11
 <i>Resultados e Discussão</i>	 12
Efeito da concentração dos substratos	12
Estudo da inibição por substrato: oxaloacetato	18
Estudo da inibição por substrato: NADH	33
Estudo da inibição por produto: L-malato	37
Ação da força iônica sobre a atividade da enzima	47
Efeito da força iônica nas curvas de saturação dos substratos ...	54
Ação combinada da força iônica e do pH	55
Ação da força iônica sobre os parâmetros cinéticos	61
 <i>Conclusões</i>	 79
<i>Apêndice</i>	80
<i>Bibliografia</i>	85

R E S U M O

Um estudo cinético com a L-malato desidrogenase mitocondrial de coração bovino foi realizado, analisando-se as anomalias cinéticas causadas por altas concentrações de oxaloacetato, NADH e L-malato e o efeito da força iônica. A inibição de substrato pelo oxaloacetato pode ser enquadrada no mecanismo de adição ordenada sequencial de dois substratos, porém, a inibição por substrato causada pelo NADH não pode ser enquadrada. As anomalias cinéticas causadas por altas concentrações de L-malato que também não podem ser enquadradas no mecanismo de adição ordenada de dois substratos, sugerem a existência de vias alternativas que levam à formação de produtos. O efeito causado pela força iônica é em geral inibitório e é simples quando os eventos que tem lugar no centro ativo da enzima são relativamente simples. Há um efeito assimétrico da força iônica nas curvas de saturação de oxaloacetato e NADH. O efeito da força iônica nas curvas de saturação com oxaloacetato e NADH, em comparação com o efeito causado às curvas de pH, apresenta diversas semelhanças. Um aumento na força iônica em pouco altera a afinidade do NADH para com a enzima mas altera substancialmente as constantes de Michaelis de ambos os substratos bem como a velocidade máxima.

INTRODUÇÃO

A reação catalizada pela L-malato desidrogenase (EC 1.1.1.37)*,



tem sido intensamente investigada desde que Thunberg(1) e Batelli & Stern (2) descobriram a utilização enzimática do L-malato pelos organismos. Além dos estudos *in vivo*, considerável interesse tem havido em estudar as propriedades da enzima purificada. A primeira purificação foi descrita por Straub (3) a partir de pó cetônico de coração de porco previamente lavado. Ochoa (4) descreveu uma modificação do método de Straub(3) porém Wolfe & Neilands (5) descreveram um método que permitiu a obtenção de uma preparação com elevado grau de pureza a partir de pó cetônico de coração de porco previamente lavado. Davies & Kun (6), isolaram a enzima a partir de pó cetônico mitocondrial de coração bovino a qual mostrou possuir as mesmas propriedades cinéticas que as enzimas isoladas por outros autores de coração inteiro previamente lavado, embora algumas propriedades físicas fossem diferentes. Englard & Siegel (7), isolaram de pó cetônico de coração bovino previamente lavado uma enzima com praticamente as mesmas propriedades cinéticas que a enzima isolada por Davies & Kun (6) enquanto que Englard & Greiger (8) demonstraram a existência de uma outra forma da enzima, facilmente extraível do músculo cardíaco bo-

* As abreviaturas utilizadas no presente trabalho são as seguintes: NAD^+ para a forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleotídeo e NADH para a forma reduzida; NADPH para a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; tris para tris(hidroximetil)aminometano; OXAL para oxaloacetato e MAL para L-malato.

vino, com propriedades cinéticas distintas da enzima isolada de pó cetônico mitocondrial ou de pó cetônico de coração previamente lavado. Englard & Siegel (7) puderam demonstrar que a enzima isolada de pó cetônico de coração previamente lavado era de origem mitocondrial, ficando assim patente a existência de duas formas da enzima nos tecidos de mamíferos, a mitocondrial e citoplasmática o que foi confirmado por outros autores (9).

Vários estudos cinéticos tem sido realizados com a enzima mitocondrial como também com a enzima citoplasmática. Raval & Wolfe (10-13) investigaram cineticamente o mecanismo de reação da enzima mitocondrial de coração de porco enquanto que, recentemente, Frieden & Fernandez-Souza (14) realizaram um estudo cinético com a enzima citoplasmática de coração de porco. Quanto às enzimas de coração bovino, Heyde & Ainsworth (15) realizaram estudos com a enzima mitocondrial, enquanto que Cassman & Englard (16) fizeram o mesmo com a enzima citoplasmática. Praticamente todos estes estudos cinéticos foram realizados em condições ideais no que se refere à concentração dos substratos a qual foi mantida em nível baixo já que é conhecido desde os primeiros trabalhos (6 a 8, 17) que ambas as enzimas apresentam anomalias cinéticas em altas concentrações dos substratos, anomalias estas que são diferentes em ambas as formas da enzima. As anomalias que ocorrem são inibição ou ativação por altas concentrações dos substratos e no caso particular da enzima mitocondrial a inibição por substrato é provocada por altas concentrações de oxaloacetato e NADH enquanto que o L-malato ocasiona ativação em altas concentrações (6, 7, 17). Kun *et al.* (18) mostraram também que a enzima mitocondrial é particularmente afetada por variações na força iônica do meio, enquanto que a enzima citoplasmática é insensível a estas variações. Os mesmos autores apresentaram também resultados indicando que as anomalias cinéticas da enzima são particularmente afetadas por variações na força iônica, sugerindo ainda que a força iônica desempenha um papel de destaque na regulação, *in vivo*, da atividade da enzima.

Heath & Phillips (19), tirando proveito dos parâmetros cinéticos já

determinados para a enzima mitocondrial, realizaram um estudo *in vivo* com a enzima mitocondrial de fígado de rato, utilizando isótopos radioativos. Estes autores puderam demonstrar que, ao contrário do que ocorre com a fumarase, a L-malato desidrogenase mitocondrial opera em condições bastante afastadas do equilíbrio químico. Outra conclusão que emerge do trabalho realizado por Heath & Phillips (19), diz respeito à atividade da enzima, a qual atinge valores muito baixos *in vivo*, valores estes bastante menores que os comumente observados *in vitro*, sendo isto verdadeiro para ambos os sentidos da reação.

Estudos estruturais também tem sido realizados, a maioria deles em datas mais recentes. Dévényi *et al.* (20) demonstraram que a enzima mitocondrial está constituída por duas subunidades bastante similares. Covelli *et al.* (21), por outro lado, descobriram a existência em mitocôndrias de uma proteína 9S com atividade de L-malato desidrogenase. A L-malato desidrogenase mitocondrial até então conhecida e estudada é uma proteína 5S (7). As propriedades desta forma pesada (9S) da L-malato desidrogenase mitocondrial foram determinadas por Consiglio *et al.* (22).

A enzima citoplasmática tem sido também objeto de intensos estudos estruturais. Os estudos de difração de raios X, realizados por Tsernoglou *et al.* (23), confirmaram a existência de duas subunidades quase idênticas como constituintes também da enzima citoplasmática, enquanto que Cassman & King (24) verificaram haver um equilíbrio monômero -dímero entre estas subunidades. Recentemente Cassman & Vetterlein (25) isolaram duas formas da enzima citoplasmática de coração bovino. Uma forma (desidrogenase b), possui cinética cooperativa em relação ao NADH e a frutose 1,6-difosfato como inibidor alostérico. A outra forma (desidrogenase a), não é afetada pela frutose 1,6-difosfato e não possui cinética cooperativa em relação ao NADH. As duas formas tem idêntica composição em aminoácidos, diferindo porém na quantidade de fosfato a elas ligado covalentemente.

O presente trabalho visa investigar as anomalias cinéticas produ-

zidas por altas concentrações dos reagentes na enzima mitocondrial de coração bovino e também averiguar a ação da força iônica sobre estas anomalias. Isto é possível desde os trabalhos desenvolvidos por Cleland (27 a 29) os quais fornecem o necessário suporte teórico. Kun *et al.* (18) não realizaram um estudo sistemático da ação dos eletrólitos sobre os parâmetros cinéticos da enzima o que também é realizado neste trabalho, levando-se em conta que a sensibilidade da enzima mitocondrial às alterações no ambiente iônico parece ser uma propriedade importante, levando-se em conta principalmente, que a enzima citoplasmática não é afetada (18, 26).

MATERIAIS E MÉTODOS

REAGENTES

NADH, NADPH, NAD^+ , oxaloacetato e L-malato foram obtidos da Sigma Chemical Company. As soluções de NADH e oxaloacetato foram feitas na hora do uso. NADH e NADPH foram dissolvidos em solução tampão apropriada enquanto que o oxaloacetato foi dissolvido em água destilada mantida a $2-3^{\circ}\text{C}$ para minimizar a descarboxilação espontânea. Soluções frescas de oxaloacetato foram preparadas de duas em duas horas. NAD^+ e L-malato foram dissolvidos em solução tampão apropriada no dia do uso. As concentrações de NADH e NADPH foram determinadas espectrofotometricamente a 340 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (30). A concentração de NAD^+ foi determinada espectrofotometricamente a 260 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $17,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ *. Oxaloacetato e L-malato foram dosados enzimaticamente com a L-malato desidrogenase.

Tris e ácido acético foram produtos da E. Merck A.G. bem como os demais eletrólitos utilizados em experiências em que a força iônica foi alterada.

PURIFICAÇÃO DA ENZIMA

A enzima, L-malato desidrogenase de coração bovino, foi purificada

* Valor fornecido pela Sigma Chemical Company.

pelo procedimento descrito por England & Siegel (7). Os autores iniciaram a purificação com pó cetônico de coração fragmentado e previamente lavado. No presente trabalho o ponto de partida para a purificação foi pó cetônico mitocondrial. As mitocôndrias foram preparadas pelo método descrito por Crane *et al.* (31). O pó cetônico mitocondrial foi preparado pelo método descrito por Ochoa (4) para o coração inteiro.

A enzima foi conservada no congelador sendo que para o uso foi diluída em tampão tris-acetato pH 8,0 e 0,05 M em acetato. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (32) usando soro albumina bovina cristalina como padrão.

OBTENÇÃO DOS DADOS EXPERIMENTAIS

Todos os dados experimentais do presente trabalho consistem ou provêm de medidas de velocidade de reação obtidas medindo-se a oxidação de NADH a 340 nm num espectrofotômetro *Varian Techtron*, termostatizado. As velocidades foram obtidas medindo-se a inclinação do gráfico traçado pelo registrador do aparelho durante o primeiro minuto da reação. Cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico foram utilizadas em todos os experimentos.

Os ensaios foram todos feitos em solução tampão tris-acetato 0,05 M em acetato. O pH foi 8,0 exceto nas experiências em que a concentração de íons hidrogênio foi variada sistematicamente. A reação foi iniciada pela adição de 0,1 ml de enzima diluída na mesma solução tampão. Os reagentes (0,1 ml) foram adicionados à cubeta sendo o volume final igual a 3 ml. Quando os reagentes não estavam dissolvidos em tampão, este estava com sua concentração corrigida para levar em conta a diluição provocada pela adição do reagente. Nas experiências nas quais se adicionou outros eletrólitos além de tris-acetato, a concentração do eletrólito foi corrigida para levar em conta a diluição provocada pela adição de reagentes e enzima. A temperatura em todas as experiências

foi $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, mantida constante por água proveniente de um banho termostático circulando pelo compartimento das cubetas no espectrofotômetro. O tampão também foi equilibrado previamente a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

A atividade específica foi medida nas mesmas condições reportadas por England & Siegel (7). Estas condições foram: tampão fosfato 0,05 M pH 7,4 sendo a concentração de ambos os substratos, oxaloacetato e NADH igual a 100 μM . Uma unidade é definida como sendo a quantidade de enzima que cataliza a transformação de 1 μmol de substrato por minuto, nas condições especificadas.

Variações na atividade da enzima foram corrigidas fazendo-se periodicamente um ensaio em condições padronizadas. Estas condições foram: temperatura, $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$; pH 8,0 com tampão tris-acetato 0,05 M em acetato; concentrações de oxaloacetato e NADH, ambas iguais a 100 μM . A atividade está expressa em nmoles de NADH oxidados por minuto.

A força iônica, μ , foi calculada pela relação, $\mu = 1/2 \sum C_i Z_i^2$, onde C é a concentração de cada íon e Z a valência de cada íon (33), e expressa em molaridade. A força iônica mínima devida aos componentes do tampão foi igual a 0,05 M. Para atingir maiores valores, vários eletrólitos foram adicionados conforme cada caso específico.

Os dados experimentais constantes dos gráficos do presente trabalho resultam da média de ao menos duas determinações, sendo três determinações o caso mais comum. Em alguns casos foram utilizadas até cinco determinações.

TRATAMENTO DOS DADOS EXPERIMENTAIS

Os dados experimentais obtidos foram submetidos a tratamento estatístico sendo os ajustes de curvas levados a efeito pelo conhecido método de mínimos quadrados (34, 35). Os dados de observação descritos pela equação da reta,

$$y = a + bx \quad (1)$$

foram ajustados utilizando-se os formulários apresentados por Wilkinson (36). Coeficientes de regressão, estimativas, bem como variâncias e erros padrões foram obtidos utilizando-se as fórmulas fornecidas por Wilkinson (36). Para os casos mais complexos, ajustes foram feitos às equações gerais,

$$y = a + bx + c/x, \quad (2)$$

$$y = a + bx + cx^2, \quad (3)$$

$$y = \frac{a + bx}{1 + cx} \quad (4)$$

e

$$y = \frac{a + bx + cx^2}{1 + dx} \quad (5)$$

Em cada caso, exceto para a equação (3), dados e fórmulas foram fornecidos a um computador eletrônico IBM 1130 do Centro de Computação Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, através de programas Fortran especificamente elaborados. Os programas incluíam informações para obtenção de estimativas, coeficientes de regressão, variâncias, coeficiente de correlação e o valor de F da distribuição de probabilidades de Snedecor para a aplicação de testes de significância (ver Apêndice). Todos os ajustes às equações (1) a (5) foram ponderados, utilizando-se como peso a velocidade elevada à quarta potência ou o inverso da variância dos dados experimentais.

Nas equações (1) a (5) y pode significar inverso de velocidade de reação, inclinação de uma reta de regressão ou a intersecção de uma reta de regressão ao eixo das ordenadas. x pode significar concentração de substrato, concentração de produto ou ainda concentração de um determinado eletrólito. Na equação (1), particularmente, x pode signi-

ficar o inverso da concentração de substrato. As constantes, a , b , c , d , resultam da combinação de diferentes constantes cinéticas.

A nomenclatura estatística utilizada é aquela adotada por Cleland (35) e Wilkinson (36).

EQUAÇÕES DE VELOCIDADE

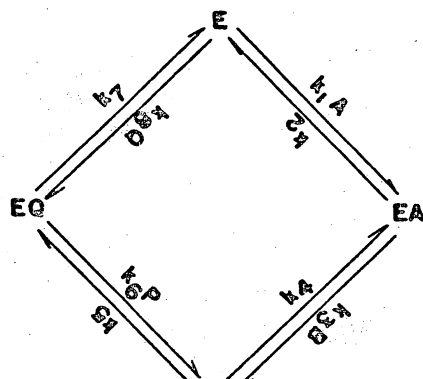
As equações de velocidade utilizadas no presente trabalho foram obtidas de Cleland (27) ou deduzidas pelo autor, utilizando a metodologia de King & Altman (37), cuja correção foi comprovada por Cleland (27) e Feraudi (38). A notação e a denominação de mecanismos de reação são aqueles utilizados por Cleland (27) e já amplamente difundidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de purificação utilizado neste trabalho permitiu a obtenção de preparações com a mesma atividade específica reportada por Englard & Siegel (7), ou seja, cerca de 1400 unidades por miligrama de proteína. A mesma atividade específica foi também reportada por Dupourque & Kun (9) para a enzima mitocondrial de rim bovino. A estabilidade da enzima diluída em solução tampão tris-acetato pH 8,0 e 0,05 M em acetato, revelou-se ser de 2 a 3 horas a 2-3°C, o que permitiu a realização das experiências aqui relatadas sem necessidade de correções de atividade na maioria dos casos.

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS SUBSTRATOS

Heyde & Ainsworth (15) mostraram que a baixas concentrações de ambos os substratos, oxaloacetato e NADH, os dados cinéticos são consistentes com um mecanismo de adição ordenada de dois substratos,



(I)

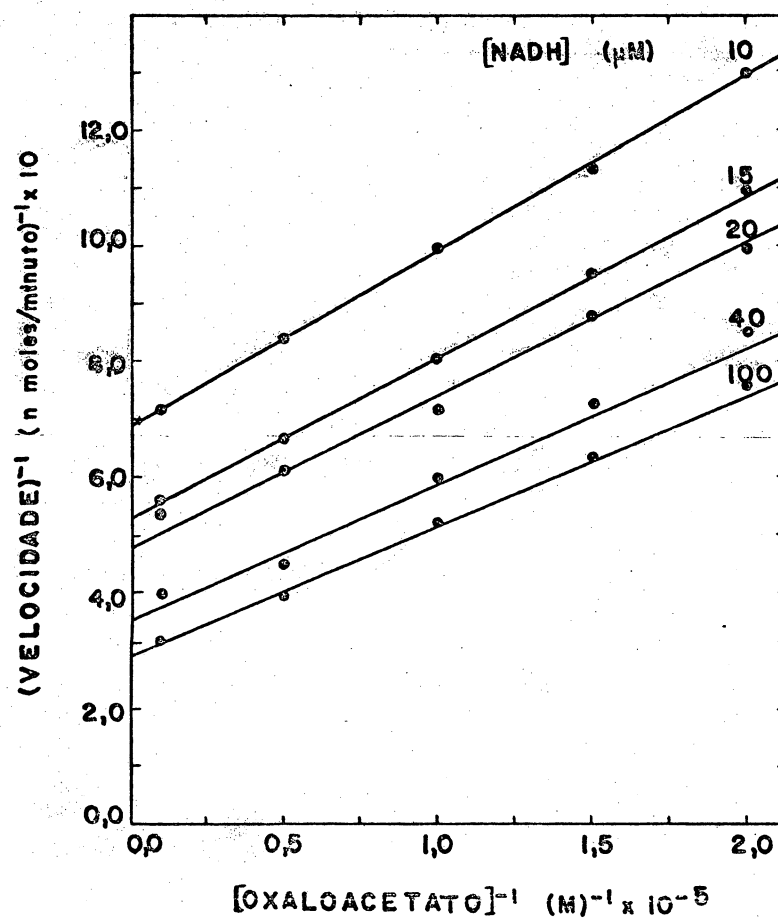


Figura 1. Inverso da velocidade inicial *versus* o inverso da concentração de oxaloacetato a diferentes concentrações de NADH. As concentrações de NADH estão indicadas à direita de cada curva. As curvas traçadas representam o ajuste ponderado de mínimos quadrados à equação da reta. Todos os dados foram obtidos a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em tampão tris-acetato pH 8,0 e 0,05 M em acetato, contendo também KCl 0,05 M. A força iônica foi igual a 0,1 M. Maiores detalhes experimentais podem ser obtidos em *Materiais e Métodos*.

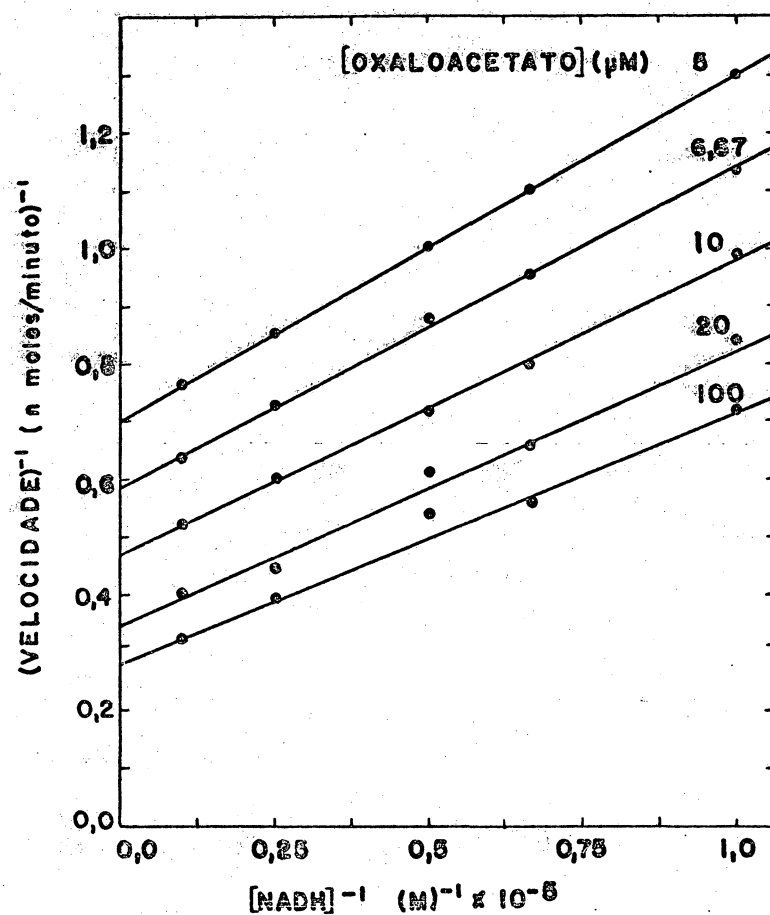


Figura 2. Inverso da velocidade inicial *versus* o inverso da concentração de NADH a diferentes concentrações de oxaloacetato. As concentrações de oxaloacetato estão indicadas à direita de cada curva. As curvas traçadas representam o ajuste ponderado de mínimos quadrados à equação da reta. Todos os dados foram obtidos a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em tampão tris-acetato pH 8,0 e 0,05 M em acetato, contendo também KCl 0,05 M. A força iônica foi igual a 0,1 M. Outros detalhes experimentais podem ser obtidos em *Materiais e Métodos*.

onde A, B, P e Q representam as concentrações de NADH, oxaloacetato, L-malato e NAD^+ , respectivamente. E representa a concentração de enzima livre. A equação de velocidade para este mecanismo, utilizando-se a notação de Cleland (27) e na ausência de produtos, é:

$$v = \frac{V_1 AB}{K_{ia}K_b + K_bA + K_aB + AB} \quad (6)$$

Na equação (6), v é a velocidade de reação e V_1 a velocidade máxima da reação na direção oxaloacetato para L-malato. K_a e K_b são as constantes de Michaelis verdadeiras para NADH e oxaloacetato respectivamente, sendo que K_{ia} é a constante de dissociação do complexo enzima-NADH.

Os estudos realizados neste trabalho a baixas concentrações dos substratos visavam a determinação de V_1 , K_b , K_a e K_{ia} em função da força iônica do meio ou ainda a determinação de padrões de inibição causados pela presença de eletrólitos. Os resultados de duas destas experiências podem ser vistas nas figuras 1 a 4, as quais mostram as curvas obtidas a uma força iônica 0,1 M. Experiências idênticas foram realizadas também com as forças iônicas 0,05; 0,2; 0,3 e 0,4 M. Na figura 3, as inclinações e intersecções obtidas da figura 1 são função do inverso da concentração de NADH, de acordo com as relações,

$$\text{inclinação}_1 = \left(\frac{K_b}{V_1} \right) + \left(\frac{K_{ia}K_b}{V_1} \right) \frac{1}{A} \quad (7)$$

e

$$\text{intersecção}_1 = \left(\frac{1}{V_1} \right) + \left(\frac{K_a}{V_1} \right) \frac{1}{A} \quad (8)$$

Similarmente, as inclinações e intersecções da figura 4, obtidas da figura 2 são função do inverso da concentração de oxaloacetato, de

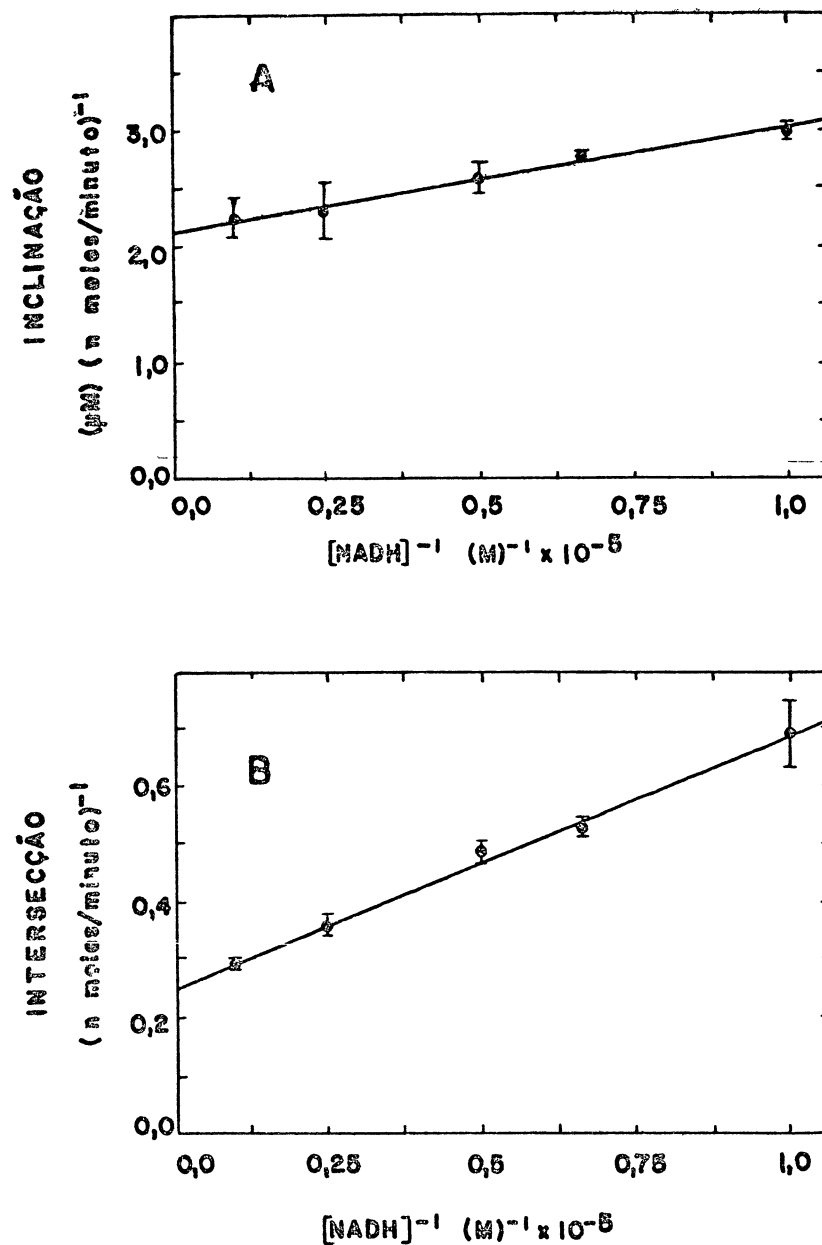


Figura 3. Inclinações (A) e intersecções ao eixo das ordenadas (B) obtidos da figura 1 *versus* o inverso da concentração de NADH. Os pontos representam inclinações ou intersecções e as barras os respectivos erros padrões obtidos pelo ajuste ponderado de mínimos quadrados à equação da reta das curvas da figura 1. As retas traçadas nos gráficos A e B representam o ajuste ponderado dos dados à equação da reta.

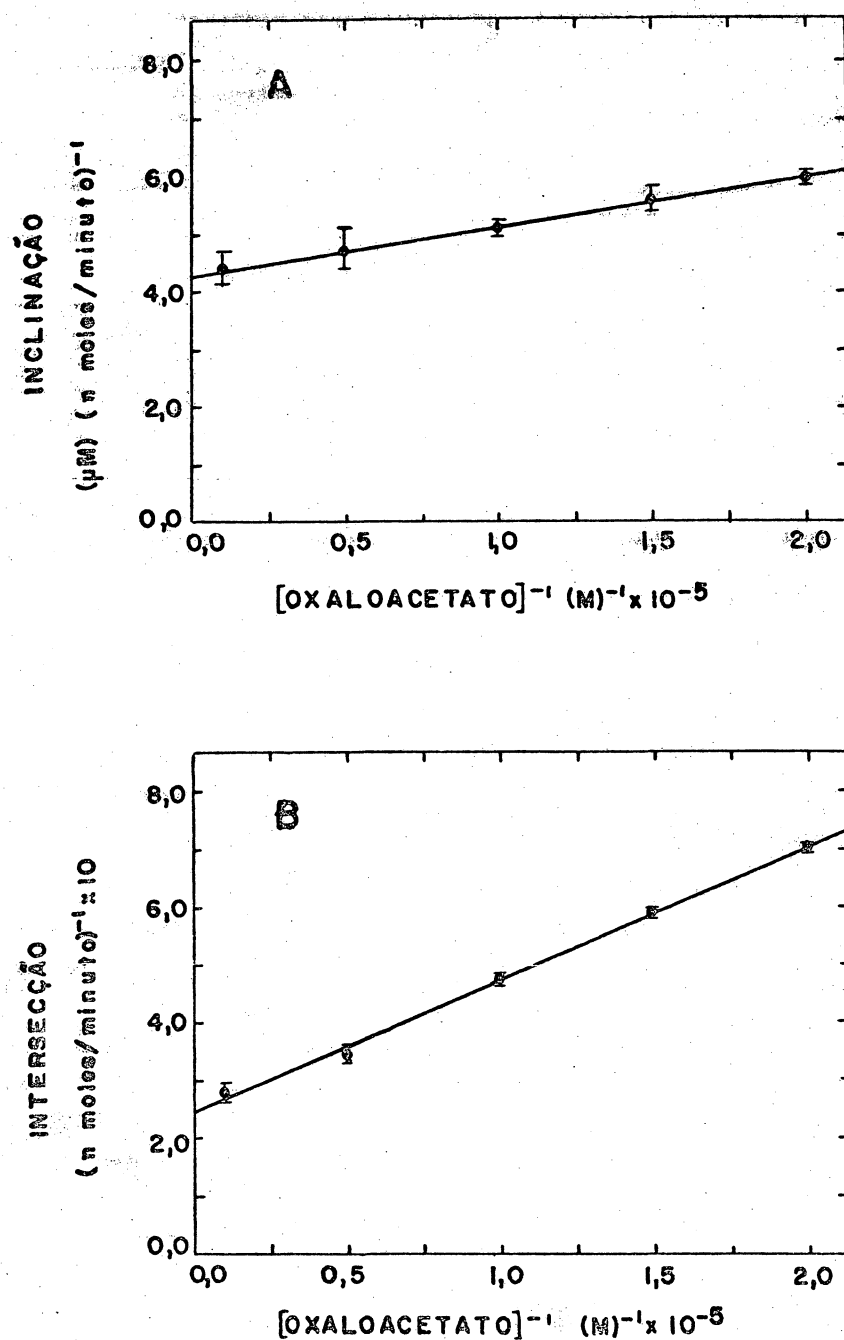


Figura 4. Inclinações (A) e intersecções ao eixo das ordenadas (B) obtidos da figura 2 *versus* o inverso da concentração de oxaloacetato. Os pontos representam inclinações ou intersecções e as barras os respectivos erros padrões obtidos pelo ajuste ponderado de mínimos quadrados à equação da reta das curvas da figura 2. As retas traçadas nos gráficos A e B representam o ajuste ponderado de mínimos quadrados dos dados à equação da reta.

acôrdo com as relações,

$$\text{inclinação}_2 = \left(\frac{K_a}{V_1} \right) + \left(\frac{K_{1a}K_b}{V_1} \right) \frac{1}{B} \quad (9)$$

e

$$\text{intersecção}_2 = \left(\frac{1}{V_1} \right) + \left(\frac{K_b}{V_1} \right) \frac{1}{B} . \quad (10)$$

As constantes cinéticas foram avaliadas através das relações (7) a (10), fazendo-se um ajuste ponderado de mínimos quadrados. Os valores das constantes cinéticas obtidas para uma força iônica igual a 0,05 M, podem ser vistas na tabela III e os resultados obtidos para forças iônicas maiores serão discutidos adiante.

O fato de a enzima apresentar inibição por altas concentrações dos substratos exige que se dê certos limites ao real significado de K_a , K_b e V_1 . K_a , independente de qual seja o mecanismo de ação da enzima, será a concentração de NADH na qual a velocidade de reação seria igual à metade da máxima a concentrações saturantes de oxaloacetato, caso não houvesse inibição por substrato. Similarmente, independente de qual seja o mecanismo de ação da enzima, K_b é a concentração de oxaloacetato na qual a velocidade da reação seria igual à metade da máxima a uma concentração saturante de NADH, caso não houvesse inibição por substrato. Finalmente, V_1 é a velocidade máxima, a qual seria também a velocidade de reação verificada experimentalmente a uma concentração saturante de ambos os substratos, caso não houvesse inibição pela alta concentração destes substratos. V_1 , portanto, não coincide com a velocidade máxima mensurável, como também não coincidem com a velocidade máxima mensurável, as velocidades máximas aparentes, função ou da concentração de oxaloacetato ou da concentração de NADH.

ESTUDO DA INIBIÇÃO POR SUBSTRATO OXALOACETATO

Na figura 5 podem ser vistas as curvas de saturação com oxaloacetato.

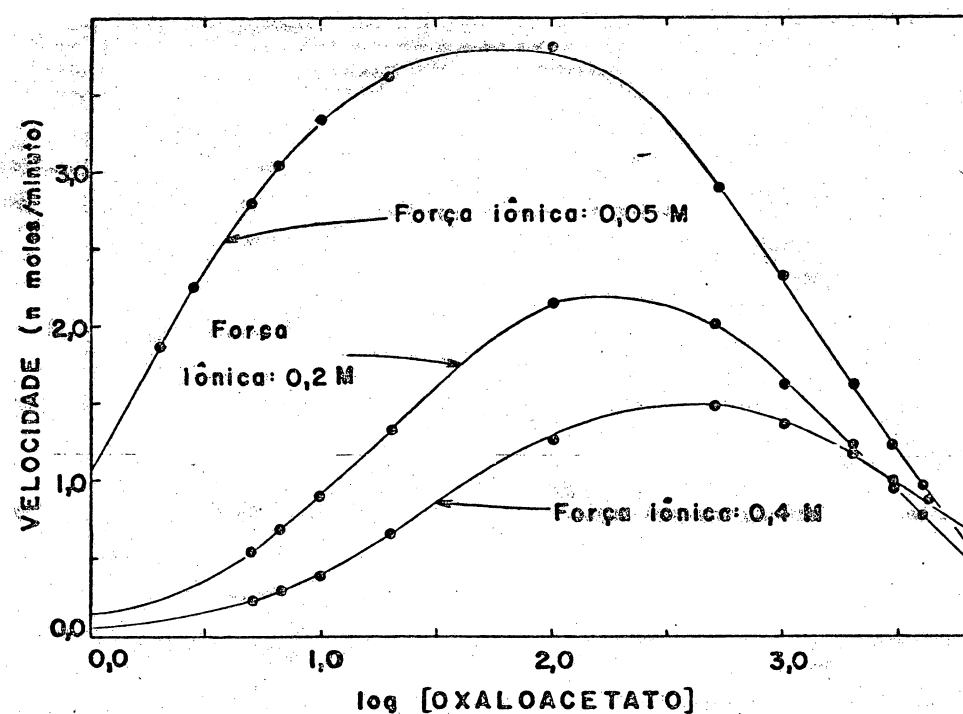


Figura 5. Velocidade de reação *versus* o logaritmo da concentração micromolar de oxaloacetato a diferentes forças iônicas. A concentração de NADH foi mantida constante e igual a 100 μ M. Todos os dados foram obtidos a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em tampão tris-acetato pH 8,0 e 0,05 M em acetato. Aumentos na força iônica acima de 0,05 M foram realizados adicionando KCl. As curvas traçadas, representam o ajuste ponderado de mínimos quadrados dos dados à equação (11). Maiores detalhes experimentais podem ser vistos em *Materiais e Métodos*.

O gráfico é semilogarítmico o qual foi utilizado para permitir uma melhor distribuição gráfica dos pontos experimentais pois as concentrações de oxaloacetato cobrem mais de três ordens de grandeza. As curvas da figura 5 são perfeitamente simétricas e por isso mesmo são descritas com precisão por uma equação semelhante à simples relação de Michaelis-Menten, diferindo desta última pela simples introdução de um termo adicional no denominador:

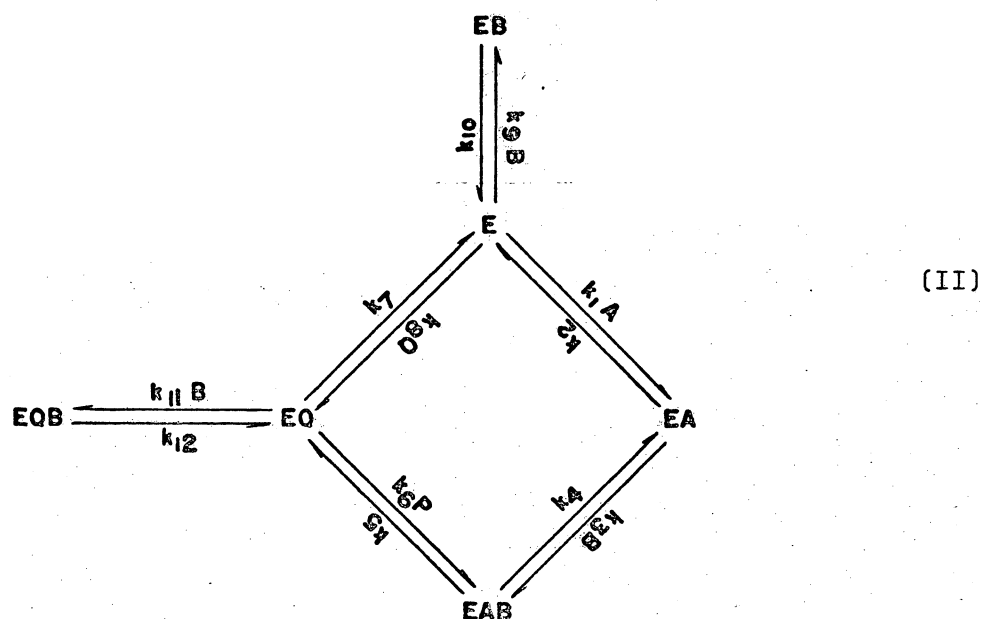
$$v = \frac{V_{ap} B}{K_{bap} + B + B^2/K_{iap}} \quad (11)$$

V_{ap} é a velocidade máxima aparente, função da concentração de NADH e K_{bap} é a constante de Michaelis aparente do oxaloacetato, também função da concentração de NADH. K_{iap} , por sua vez, é uma constante de inibição aparente do oxaloacetato, função complexa de uma série de outras constantes e também da concentração de NADH. Esta equação já é conhecida e utilizada para descrever este tipo de inibição por substrato de longa data (39, 40) e na forma duplamente recíproca, torna-se igual à equação geral (2), forma que foi aproveitada para o ajuste de mínimos quadrados.

A equação (11) permite um estudo cinético que pode dar resultados bastante conclusivos em termos mecanísticos. Cleland (40) mostrou que um máximo de informações podem ser obtidas com uma experiência semelhante à da figura 6. No gráfico da figura 6, o substrato variável é NADH e a cada curva corresponde uma concentração fixa e diferente de oxaloacetato, incluindo não apenas concentrações nas quais não há inibição por substrato, mas também, concentrações nas quais esta inibição se faz presente. Pode-se depreender da figura 6 que a partir de uma concentração igual a 2 μ M, a inclinação e a intersecção ao eixo das ordenadas diminuem progressivamente até que se atinja uma concentração igual a 100 μ M. A partir de então, a inclinação e a intersecção ao eixo das ordenadas voltam a aumentar até a concentração limite utilizada. Como inibidor, o oxaloacetato afeta tanto a inclinação como

a intersecção ao eixo das ordenadas, o que caracteriza a inibição não-competitiva na nomenclatura geral utilizada por Cleland (28).

A explanação mais simples que se pode formular, a qual não exclui outras possibilidades, é o seguinte mecanismo de ação enzimática:



O mecanismo II é essencialmente o mecanismo I proposto por Heyde & Ainsworth (15) ao qual se acrescentou a possibilidade da formação de dois complexos inibitórios, EB e EQB.

A equação de *steady-state* para o mecanismo II pode ser facilmente derivada com o auxílio do algoritmo de King & Altman (37) e na presença de produtos pode ser escrita da seguinte maneira:

$$v = \frac{V_1 (AB - PQ/K_{eq})}{K_{ia}K_b + K_aB + K_bA + AB + (K_qK_{ia}K_b/K_pK_{i1q})P + (K_{ia}K_b/K_{i1q})Q + ABP/K_{ip} + (K_qK_b/K_{i1q}K_p)AP + (K_bK_{ia}/K_pK_{i1q})PQ + (K_a/K_{i2q})BQ + (1/K_{ibq/a})QB^2 + (K_bK_{ia}/K_pK_{i1q}K_{i3b})BPQ + (K_a/K_{i1b})B^2 + (K_{ia}K_{i4b}/K_{i1b}K_{ip})BP + (1/K_{i2b})AB^2}$$

(12)

K_a , K_b , K_{ia} e V_1 possuem o mesmo significado que lhes foi atribuído

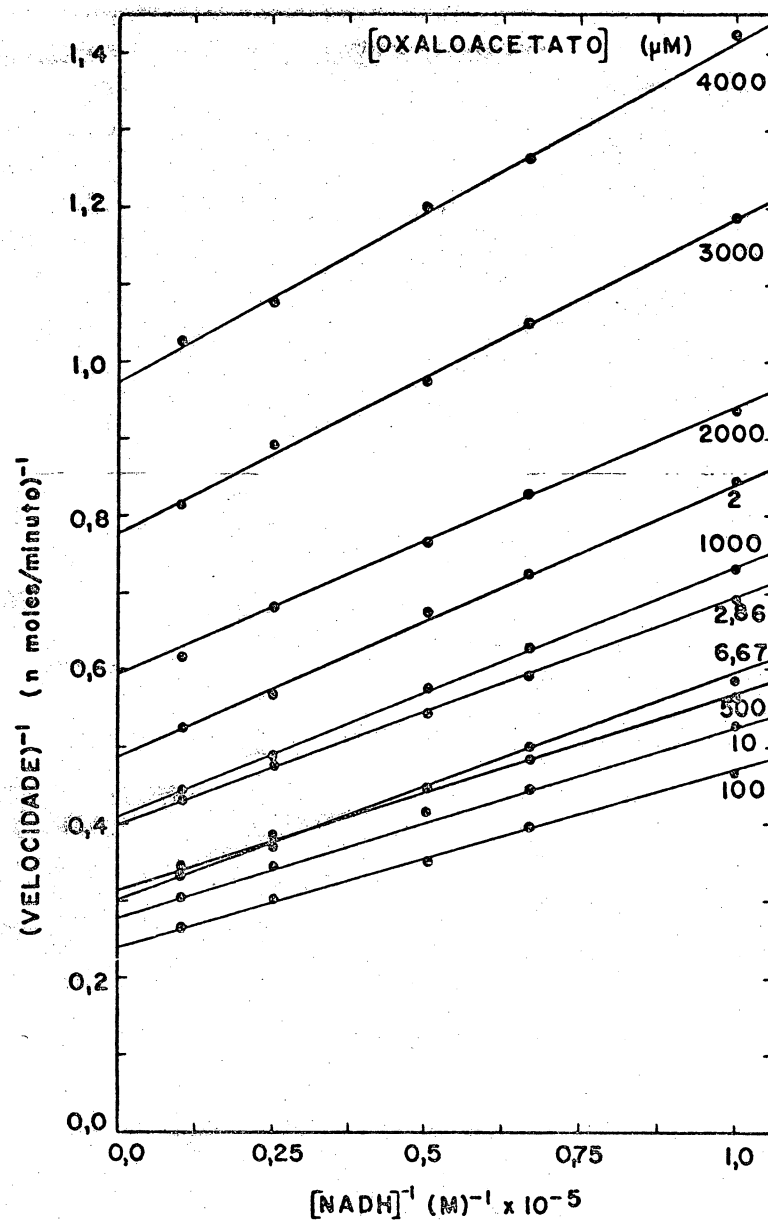


Figura 6. Inverso da velocidade inicial *versus* o inverso da concentração de NADH a diferentes concentrações de oxaloacetato. As concentrações de oxaloacetato, que estão indicadas à direita de cada curva, incluem tanto concentrações nas quais não há inibição por substrato, como também concentrações nas quais há inibição por substrato. As curvas que correspondem a oxaloacetato 5 e 20 μM foram omitidas para maior clareza. As curvas traçadas representam o ajuste ponderado de mínimos quadrados à equação da reta. Todos os dados foram obtidos a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em tampão tris-acetato pH 8,0 e 0,05 M em acetato. Outros detalhes experimentais podem ser obtidos em *Materiais e Métodos*.

na equação (6). K_{i1q} , por sua vez, é a constante de dissociação do complexo enzima- NAD^+ enquanto que K_q e K_p são as constantes de Michaelis verdadeiras para NAD^+ e L-malato, respectivamente. K_{i1b} é a constante de dissociação do complexo enzima-oxaloacetato. K_{i2b} e K_{i3b} são constantes de inibição aparentes do oxaloacetato. K_{ip} é a constante de inibição aparente do L-malato e K_{eq} é a constante de equilíbrio da reação. Em relação ao mecanismo I, o mecanismo II exige a introdução de vários termos adicionais no denominador da equação de velocidade completa (15). São eles os termos em B^2 , AB^2 , QB^2 e BP . Na tabela I podem ser comparados os significados das constantes cinéticas comuns aos mecanismos I e II, em termos de constantes de velocidade. Na tabela II pode-se apreciar o significado das constantes adicionais introduzidas no mecanismo II. A constante cinética V_2 , que é a velocidade máxima do sentido inverso da reação, L-malato para oxaloacetato, não consta da equação (12) por ter sido substituída por diferentes combinações das demais constantes cinéticas.

A observação da tabela I revela que K_a tem um significado mais complexo em termos de constantes de velocidade no mecanismo II. Porém, um exame acurado revela que a definição de K_a no mecanismo II é igual à soma do significado de K_a no mecanismo I com dois termos adicionais, formados por uma combinação de constantes de velocidade. Estes dois termos adicionais, por sua vez, resultam do produto de K_{ia} por uma combinação de constantes de velocidade. Os valores medidos de K_a são da ordem de 10^{-5} M enquanto que os valores de K_{ia} são da ordem de 10^{-6} M. Por isso, para que os termos adicionais possam dar uma contribuição efetiva ao valor de K_a , os fatores que multiplicam K_{ia} devem ser ao menos da ordem de 10^{-1} M. Uma tal dimensão resulta extremamente improvável como o revelou exame comparativo com os valores em geral obtidos para combinações semelhantes de constantes de velocidade. Por isso, muito provavelmente, para efeitos práticos, o significado de K_a é idêntico em ambos os mecanismos.

Deve-se notar ainda que no mecanismo I, $K_{i1q} = K_{i2q}$, enquanto que K_{i2q} , no mecanismo II, tem um significado bastante complexo.

TABELA I

Significado das constantes cinéticas comuns aos mecanismos I e II, em termos de constantes de velocidade de acordo com a notação e nomenclatura de Cleland (27). Para o mecanismo I os dados foram obtidos de Cleland (27). Para o mecanismo II, as relações foram derivadas pelo algoritmo de King & Altman (37). E_t representa a concentração total de enzima. Maiores esclarecimentos são dados no texto.

CONSTANTE CINÉTICA	SIGNIFICADO DAS CONSTANTES CINÉTICAS	
	Mecanismo I	Mecanismo II
K_{ia}	$\frac{k_2}{k_1}$	$\frac{k_2}{k_1}$
K_{iiq}	$\frac{k_7}{k_8}$	$\frac{k_7}{k_8}$
K_{i2q}	$\frac{k_7}{k_8}$	$\frac{k_3k_5k_7 + (k_2k_5k_7)(k_9/k_{10}) + (k_2k_4k_7)(k_9/k_{10})}{k_3k_5k_8 + (k_2k_5k_8)(k_{11}/k_{12}) + (k_2k_4k_8)(k_{11}/k_{12})}$
K_a	$\frac{k_5k_7}{k_1(k_5 + k_7)}$	$\frac{k_3k_5k_7 + (k_2k_5k_7)(k_9/k_{10}) + (k_2k_4k_7)(k_9/k_{10})}{k_1(k_5 + k_7)k_3}$
K_b	$\frac{k_7(k_4 + k_5)}{k_3(k_5 + k_7)}$	$\frac{k_7(k_4 + k_5)}{k_3(k_5 + k_7)}$
K_q	$\frac{k_2k_4}{k_8(k_2 + k_4)}$	$\frac{k_2k_4}{k_8(k_2 + k_4)}$
K_p	$\frac{k_2(k_4 + k_5)}{k_6(k_2 + k_4)}$	$\frac{k_2(k_4 + k_5)}{k_6(k_2 + k_4)}$
K_{i3b}	$\frac{k_2 + k_4}{k_3}$	$\frac{k_2 + k_4}{k_3}$
K_{ip}	$\frac{k_5 + k_7}{k_6}$	$\frac{k_5 + k_7}{k_6}$
V_2	$\frac{k_2k_4E_t}{k_2 + k_4}$	$\frac{k_2k_4E_t}{k_2 + k_4}$
V_1	$\frac{k_5k_7E_t}{k_5 + k_7}$	$\frac{k_5k_7E_t}{k_5 + k_7}$
K_{eq}	$\frac{k_1k_3k_5k_7}{k_2k_4k_6k_8}$	$\frac{k_1k_3k_5k_7}{k_2k_4k_6k_8}$

TABELA II

Significado das constantes cinéticas existentes apenas na equação de velocidade do mecanismo II em termos de constantes de velocidade de acordo com a notação e nomenclatura de Cleland (27). As relações foram derivadas com auxílio do algoritmo de King & Altman (37).

CONSTANTE CINÉTICA	SIGNIFICADO
K_{i1b}	$\frac{k_{10}}{k_9}$
K_{i2b}	$\frac{(k_5 + k_7)k_{12}}{k_5k_{11}}$
K_{i4b}	$\frac{k_4}{k_3}$
$K_{ibq/a}$	$\frac{k_1(k_5 + k_7)k_{12}}{k_5k_8k_{11}}$

Na tabela II pode-se ver que apenas a constante de dissociação do complexo EB pode ser obtida no tipo de experimentos aqui relatados. K_{i2b} não é realmente a constante de dissociação do complexo EQB e sim o seu produto por uma combinação de constantes de velocidade. Porém, se $k_5 \gg k_7$, então o valor medido, na prática, será igual à constante de dissociação do complexo EQB.

Se na equação (12) impomos a condição $P = Q = 0$, isto é, na ausência de produtos, a equação reduz-se a uma expressão mais simples, que na forma duplamente recíproca pode ser escrita:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_a}{V_1} \left(\frac{K_{i1}K_b}{K_aB} + \frac{B}{K_{i1b}} + 1 \right) \frac{1}{A} + \frac{1}{V_1} \left(1 + \frac{K_b}{B} + \frac{B}{K_{i2b}} \right) \quad (13)$$

A equação (13) difere das formas recíprocas da equação (6) pela inclusão dos termos B/K_{i1b} e B/K_{i2b} . Estes termos são significativos apenas a concentrações relativamente elevadas de oxaloacetato, pois a concentrações baixas de oxaloacetato o gráfico secundário de inclinações e intersecções é função linear do inverso da concentração de oxaloacetato.

A inclinação e a intersecção são dadas por:

$$\text{inclinação}_3 = \left(\frac{K_{i1}K_b}{V_1} \right) \frac{1}{B} + \left(\frac{K_a}{V_1 K_{i1b}} \right) B + \left(\frac{K_a}{V_1} \right) \quad (14)$$

e

$$\text{intersecção}_3 = \left(\frac{K_b}{V_1} \right) \frac{1}{B} + \left(\frac{1}{V_1 K_{i2b}} \right) B + \left(\frac{1}{V_1} \right) \quad (15)$$

As equações (14) e (15) enquadram-se na equação (2), mencionada em *Materiais e Métodos*. Para ver se os dados experimentais se ajustam à

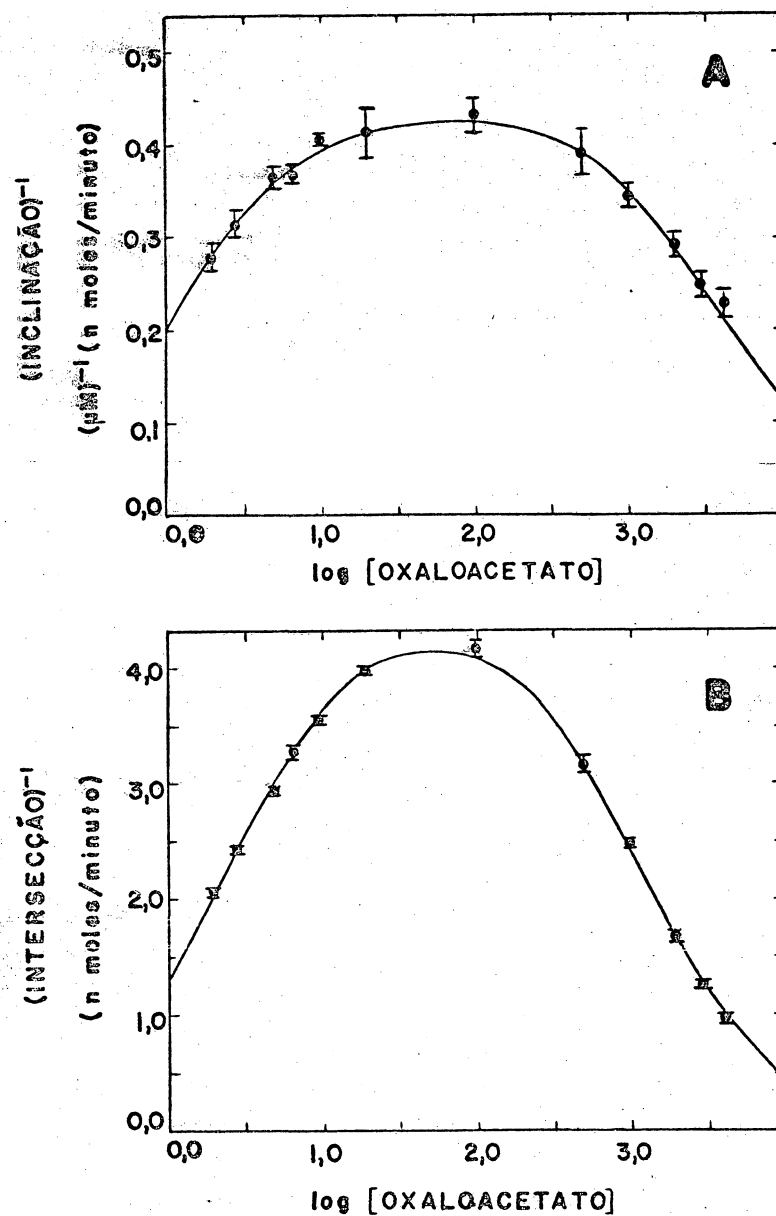


Figura 7. Inverso das inclinações (A) e inversos das intersecções ao eixo das ordenadas (B) obtidos da figura 6, *versus* o logaritmo da concentração micromolar de oxaloacetato. Os pontos representam o inverso das inclinações ou o inverso das intersecções e as barras os respectivos erros padrões obtidos pelo ajuste ponderado de mínimos quadrados à equação da reta das curvas da figura 6. As curvas traçadas nos gráficos A e B representam o ajuste ponderado dos dados às equações (14) e (15) respectivamente.

teoria, realizou-se um ajuste de mínimos quadrados para cada caso. Os gráficos A e B da figura 7, mostram que dentro dos limites do erro experimental, o ajuste é realmente satisfatório. Na figura 7, colocou-se nos gráficos os inversos das inclinações e intersecções contra o logaritmo da concentração de oxaloacetato, para permitir uma melhor distribuição dos pontos e para que a curva ficasse com a concavidade voltada para baixo. Este tipo de gráfico permite também apreciar melhor as relações de predominância que exercem os termos em B e em B^{-1} nas equações (14) e (15). Na primeira fase, ascendente na figura 7, predomina o termo em B^{-1} enquanto que na fase descendente, apenas o termo em B é significativo. Porém, na fase intermediária, ambos os termos são significativos. É impossível, portanto, detectar qualquer fenômeno relativo à inibição por substrato em estudos de velocidade inicial, caso nestes estudos se utilize a fase em que apenas os termos em B^{-1} são significativos. Uma verificação da tabela III revela que as duas constantes de inibição, K_{i1b} e K_{i2b} , são bem maiores que as demais constantes cinéticas. Na realidade a diferença é de três ordens de grandeza, daí os termos que contêm B no numerador da equação (13) serem significativos apenas quando B for relativamente grande.

As porções descendentes das curvas das figuras 5 e 7, na realidade encerram uma relação linear entre o inverso da velocidade de reação, inclinação ou intersecção ao eixo das ordenadas e a concentração de oxaloacetato. Uma amostra disto é o gráfico A da figura 8, o qual mostra a relação linear entre o inverso da velocidade de reação e a concentração de oxaloacetato, dentro da faixa em que há inibição por substrato.

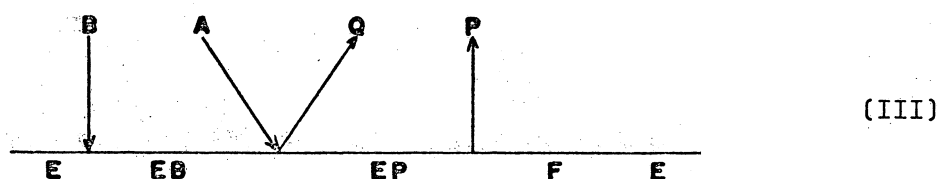
As constantes cinéticas K_a , K_{ia} , K_b e V_1 que aparecem nas equações (14) e (15) são teoricamente as mesmas que aquelas que ocorrem nas equações (7) a (10), e a serem corretas as suposições feitas acima, os valores obtidos utilizando baixas concentrações de oxaloacetato deveriam coincidir com os valores obtidos utilizando altas e baixas concentrações de oxaloacetato. A tabela III mostra que dentro de uma certa margem de erro experimental os valores obtidos em ambos os tipos de experiência concordam razoavelmente.

TABELA. III

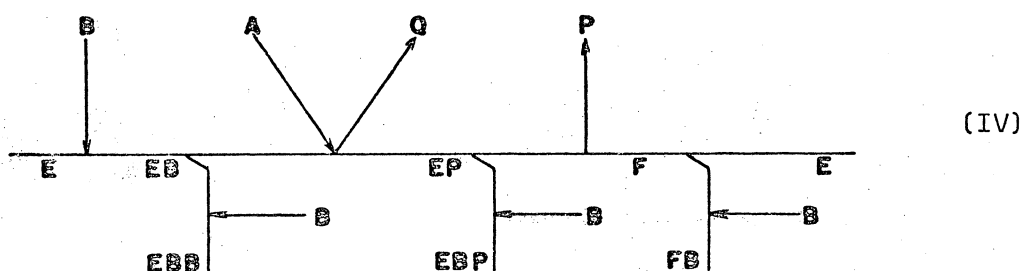
Comparação entre os valores das constantes cinéticas obtidas a baixas concentrações de oxaloacetato utilizando a equação (6) e os valores obtidos a baixas e altas concentrações de oxaloacetato, utilizando a equação (13). As condições experimentais foram: tampão tris-acetato pH 8,0 e 0,05 M em acetato; temperatura: $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Maiores detalhes experimentais podem ser vistos em *Materiais e Métodos*.

Constantes cinéticas.	Valores obtidos com baixas concentrações de oxaloacetato.	Valores obtidos com baixas e altas concentrações de oxaloacetato.
K _{ia} (μM)	4,74±0,57	4,74
K _a (μM)	9,70±0,23	10,32
K _b (μM)	2,42±0,17	2,47
V ₁ (nmoles/min.)	4,41±0,10	4,54
K _{i1b} (mM)	-	4,03
K _{i2b} (mM)	-	1,18

Os resultados do estudo da inibição por substrato pelo oxaloacetato revelam, portanto, que esta inibição pode ser enquadrada no mecanismo I proposto por Heyde & Ainsworth (15). Cleland (27, 28) mostrou que estudos de inibição por produtos, idênticos aos realizados por Heyde & Ainsworth (15) para propor o mecanismo I, não podem permitir uma distinção entre o mecanismo I e o mecanismo iso-Theorell-Chance, abaixo:



F, representa uma forma isômera, estável da enzima. O mecanismo III apresenta o mesmo padrão de inibição por produtos que o mecanismo I (28). Na realidade as equações de velocidade dos mecanismos I e III são idênticas quando escritas na forma de coeficientes (27). Por isto, os dados de Heyde & Ainsworth (15) são consistentes também com o mecanismo III, embora os mecanismos do tipo Theorell-Chance sejam encarados com ceticismo (27). A inibição por substrato causada pelo oxaloacetato, por outro lado, não pode ser enquadrada tão facilmente no mecanismo III. Como se viu, a inibição causada pelo oxaloacetato é não-competitiva e para que isso ocorra é necessário que na equação de velocidade apareçam termos em B^2 e AB^2 no denominador. Se houver apenas termos em B^2 a inibição será competitiva e se houver apenas termos em AB^2 , será incompetitiva. No caso do mecanismo III, os termos em B^2 e AB^2 somente apareceriam na equação de velocidade, caso se admitisse a formação dos complexos inibitórios EBB, EBP e FB:



A equação de velocidade do mecanismo (IV) seria praticamente idên-

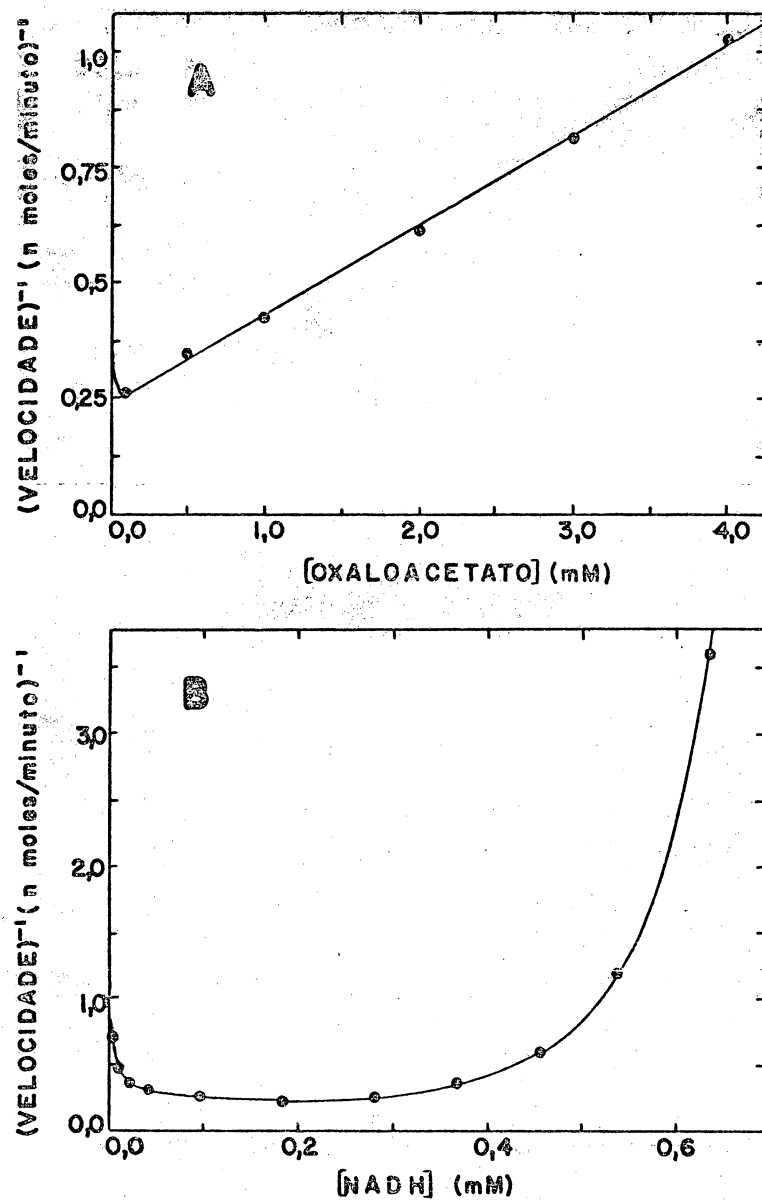


Figura 8. Inverso da velocidade *versus* concentração de oxaloacetato (A) ou concentração de NADH (B). No gráfico A a concentração de NADH foi igual a 100 μ M e no gráfico B a concentração de oxaloacetato foi igual a 100 μ M. Todos os dados foram obtidos a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em tampão tris-acetato pH 8,0 e 0,05 M em acetato. No gráfico A os pontos experimentais correspondentes a concentrações de oxaloacetato inferiores a 0,1 mM foram omitidos. Também no gráfico A, a curva traçada corresponde ao ajuste ponderado de mínimos quadrados dos dados experimentais à equação (11). Maiores detalhes experimentais podem ser vistos em *Materiais e Métodos*.

tica à equação de velocidade do mecanismo II se escrita na forma de coeficientes, apenas com um termo a mais, termo este em APB^2 . A inibição de substrato pelo oxaloacetato seria não-entanto, não-competitiva e os dados experimentais portanto são consistentes com o mecanismo IV. No entanto, uma análise do mecanismo IV revela que é necessário fazer suposições bem pouco plausíveis no tocante aos complexos inibitórios. O mecanismo IV não possui complexos ternários ativos e no entanto é necessário admitir-se a existência dos complexos ternários inativos EBB e EBP. A introdução do complexo EBB pode gerar um termo em B^2 e o complexo EBP pode originar um termo em AB^2 . A formação de complexos como esses resulta pouco lógica pois admite-se que o oxaloacetato possa formar complexos inibitórios em locais onde NADH e NAD^+ deveriam mas não podem formar complexos ativos. Mais razoável é o complexo inibitório FB o qual porém origina apenas um termo em AB^2 . A possibilidade da formação de um complexo inativo EB a par de outro ativo é irrelevante pois este não originaria termos quadráticos em B. Estes argumentos são importantes no que se refere a uma possível distinção entre os mecanismos I e II de um lado e III e IV de outro. Estes últimos podem ser apontados como bastante improváveis em virtude de serem bem pouco plausíveis os complexos inibitórios, EBB, EBP, FB, necessários para explicar a inibição não-competitiva causada pelo oxaloacetato. Silverstein & Sulebele (41) apontaram também evidências favoráveis ao mecanismo I num estudo cinético no qual utilizaram isótopos radioativos. Os mesmos autores, no entanto, não detectaram os complexos inibitórios EB e EBQ, porém apontaram evidências favoráveis à existência de um complexo abortivo, EAP. A existência de um complexo EAP, no entanto, é fenômeno contraditório já que neste caso o L-malato deveria ocasionar inibição por substrato em altas concentrações quando na realidade o que ocorre é ativação (6, 7, 15). Raval & Wolfe (13) também postularam a formação de complexos EB e EQB num estudo realizado com a enzima mitocondrial de coração de porco, a qual também, aparentemente, segue o mecanismo I a baixas concentrações de substratos. Se estes complexos EB e EQB não existem, torna-se difícil enquadrar a inibição por substrato causada pelo oxaloacetato no mecanismo I, sendo necessário admitir-se outro sítio de ligação, independente do centro ativo, no qual a

ligação do oxaloacetato produziria complexos inibitórios. Se este for o caso, tais complexos deveriam ser completamente inativos já que se este não fosse o caso, a curva do gráfico A da figura 8, deveria ser uma hipérbole ou de maior complexidade (40), quando na realidade, a relação é perfeitamente linear.

ESTUDO DA INIBIÇÃO POR SUBSTRATO: NADH

Quando comparada com a inibição provocada por altas concentrações de oxaloacetato, o mesmo fenômeno provocado por altas concentrações de NADH mostra vários aspectos fundamentalmente diferentes. Primeiramente, como mostra a figura 9, não são necessárias concentrações muito elevadas para provocar uma inibição quase completa. Numa concentração em torno de 0,63 mM, a velocidade da reação é apenas 6% da máxima verificada experimentalmente. Como inibidor, o NADH é pois altamente eficiente. Em segundo lugar, a inibição por NADH não é linear, como se pode ver claramente na figura 8-B e por isso mesmo não pode ser descrita por uma relação tão simples como a equação (11). A figura 8-B sugere a presença de termos quadráticos em A na forma recíproca das equações de velocidade, porém, os dados não se ajustam a uma equação que descreve a inibição parabólica por substrato (40),

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_{aap}}{V_{ap}} \right) \frac{1}{A} + \frac{1}{V_{ap}} (1 + aA + bA^2), \quad (16)$$

fato que uma análise de mínimos quadrados comprovou. Embora não haja dúvidas, pela forma da curva do gráfico 8-B, que deve haver termos quadráticos em A, ou de maior ordem, na equação de velocidade, é bastante difícil visualizar a relação correta. Além de termos quadráticos em A ou de maior ordem, devem também existir termos em A no denominador do termo que multiplica $1/V_{ap}$, pois a simples adição de termos ao numerador não pode explicar a porção central da curva da figura 8-B, a não ser talvez, com a introdução de termos negativos, o que porém, é desprovido de significado.

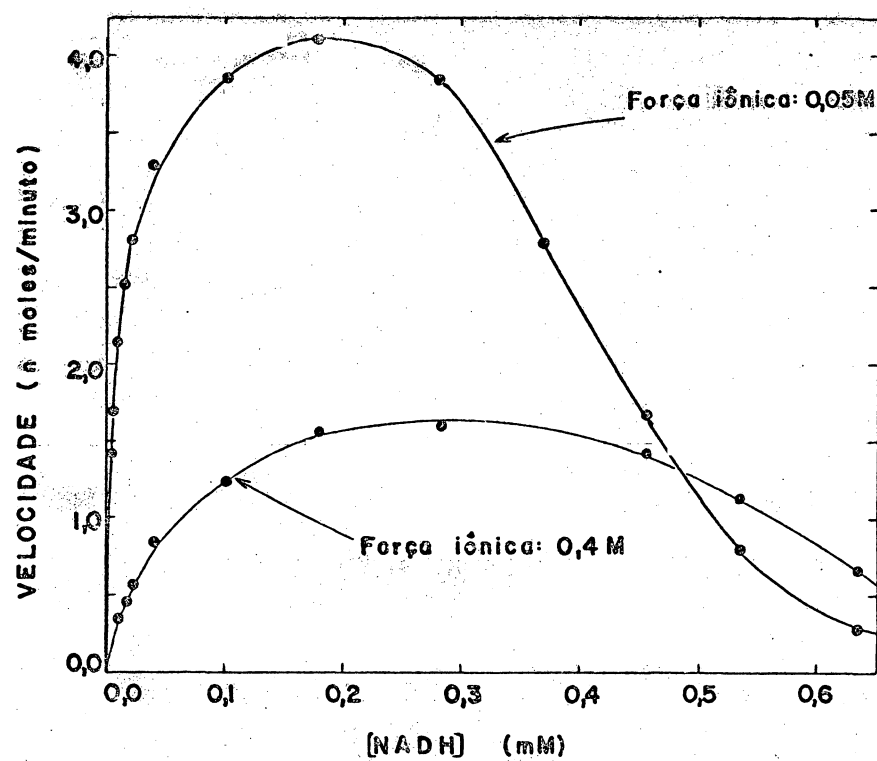


Figura 9. Velocidade de reação *versus* a concentração de NADH a diferentes forças iônicas. A concentração de oxaloacetato foi mantida constante e igual a 100 μ M. Todos os dados foram obtidos a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em tampão tris-acetato pH 8,0 e 0,05 M em acetato. Aumentos na força iônica acima de 0,05 M foram realizados adicionando KCl. Maiores detalhes experimentais podem ser obtidos em *Materiais e Métodos*.

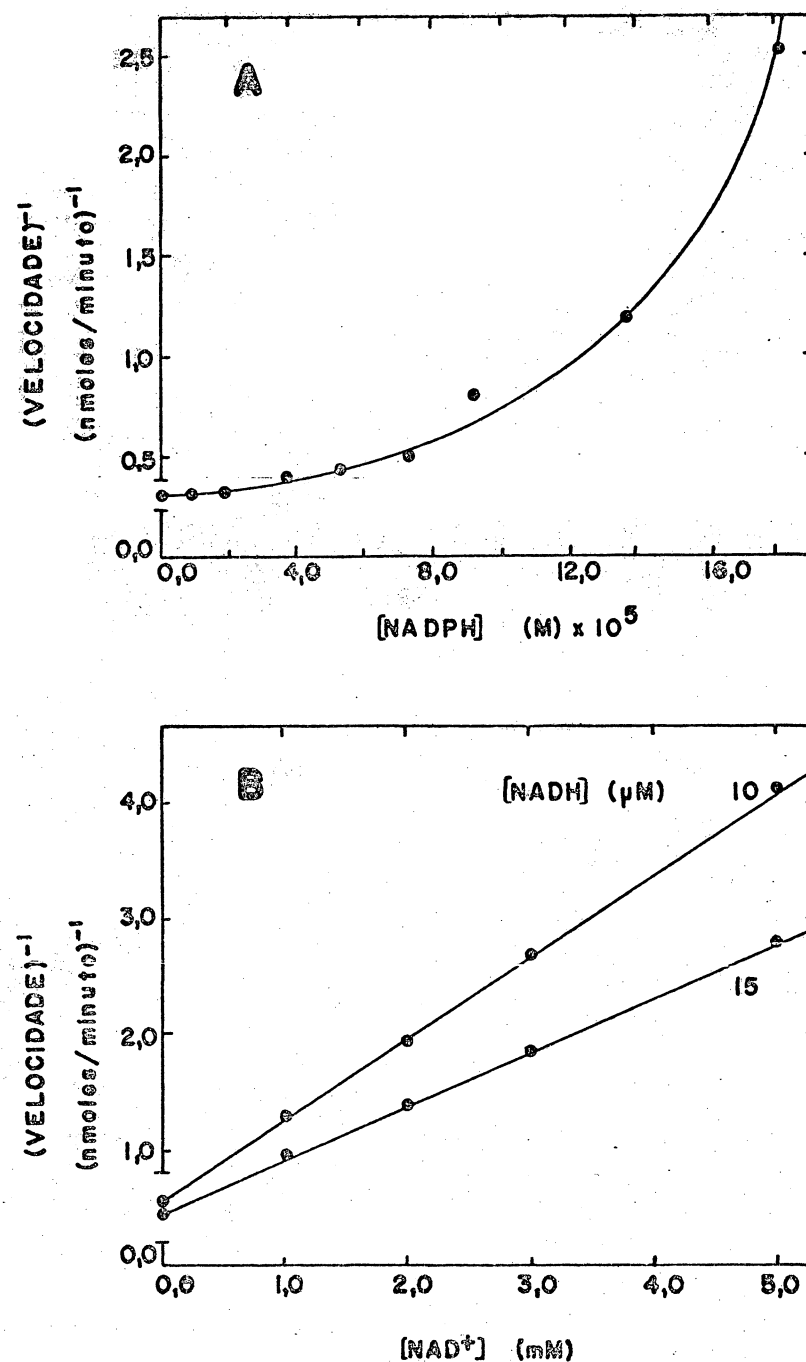


Figura 10. Inverso da velocidade de reação *versus* a concentração de NADPH (A) ou NAD⁺ (B). Na experiência do gráfico A as concentrações de NADH e oxaloacetato foram ambas iguais a 100 μM. Na experiência do gráfico B a concentração de oxaloacetato foi 20 μM. Todos os dados foram obtidos a 25,0±0,5°C em tampão tris-acetato pH 8,0 e 0,05 M em acetato. Maiores detalhes experimentais podem ser vistos em *Materiais e Métodos*.

Enquadrar a inibição por NADH nos mecanismos I e II, em vista dos dados experimentais, apresenta uma série de dificuldades. Particularmente, a necessidade de se incluir termos contendo A no denominador da forma duplamente recíproca da equação de velocidade, fala a favor de sítios de ligação insuspeitados por outros dados cinéticos. Cleland (40) mostra que a introdução de termos contendo a concentração de qualquer inibidor, seja produto ou substrato, no denominador da forma duplamente recíproca das equações de velocidade, testemunha a favor da existência de vias alternativas que levam à formação de produto. Uma via alternativa pode ser devida a uma inibição parcial em que os complexos inibitórios ainda dão origem a produtos, porém, numa velocidade menor. No presente caso, é possível que dois tipos de inibição se superponham: um parcial e outro completo. O primeiro predominando na porção central da curva da figura 8-B e o segundo tornando-se significativo apenas na porção final da mesma curva. Seja como for, a utilização de baixas concentrações de NADH é perfeitamente coerente de experiência a experiência, o que leva a crer que por complexa que seja, a expressão limite que descreve a dependência da velocidade de reação da concentração de NADH é realmente a simples relação de Michaelis-Menten.

Uma experiência adicional, mostrada no gráfico A da figura 10, utilizando NADPH que como substrato é praticamente nulo e que na presença de NADH inibe a atividade da enzima, mostrou que um gráfico do inverso da velocidade de reação *versus* a concentração de NADPH também mostra uma curvatura, semelhante à da figura 9-B. Este resultado contraria o que se esperaria obter caso o NADPH apenas competisse com o NADH pelo sítio de ligação deste último, pois neste caso, a curva do gráfico A da figura 10 deveria ser linear. Uma das interpretações que se pode dar a este fenômeno é que o NADPH, além de competir com o NADH pelo sítio de ligação deste, também age de forma semelhante ao NADH na formação de ao menos alguns dos complexos inibitórios que este é capaz de formar. Se assim for, pode-se dizer também que este efeito é aparentemente específico para as formas reduzidas das coenzimas, pois com a forma oxidada, NAD^+ , nenhum efeito semelhante foi observado, embora a máxima con-

concentração de NAD^+ utilizada supere em dez vezes a máxima concentração de NADH empregada. Isto pode ser visto no gráfico B da figura 10. As relações lineares que se vêem aí, são justamente as previstas para uma competição do NAD^+ com o NADH pelo mesmo sítio de ligação, sem que haja nenhuma ação semelhante ao NADH ou NADPH na formação de outros complexos inibitórios.

A inibição por substrato pela coenzima não é fenômeno comum entre as desidrogenases, porém, é também muito pouco estudado. Hakala *et al.* (42) mostraram que para a lactato desidrogenase, a inibição por substrato pelo NADH era detectável a baixas concentrações de piruvato, porém inexistente a concentrações relativamente altas de piruvato. É possível que uma limitação técnica desfavoreça estudos a altas concentrações de NADH, pois a densidade ótica de soluções com concentração superior a 1 mM é muito grande no comprimento de onda utilizado. Nenhuma experiência adicional foi realizada para averiguar o possível mecanismo da inibição de substrato causada por NADH já que dificilmente resultados conclusivos poderiam ser obtidos dadas as limitações da cinética de *steady-state* em lidar com relações complexas como as que aqui foram descritas.

ESTUDO DA INIBIÇÃO POR PRODUTO: L-MALATO

O estudo cinético da reação catalizada pela L-malato desidrogenase na direção L-malato para oxaloacetato apresenta sérias dificuldades devido à desfavorabilidade da constante de equilíbrio (6, 15). Por isso, o seu estudo não pode ser feito sem o uso de técnicas especiais (14, 15). Em vista disso, no presente trabalho, decidiu-se estudar as anomalias cinéticas produzidas por altas concentrações de L-malato, examinando a inibição por produto que este reagente ocasiona na direção oxaloacetato para L-malato.

Heyde & Ainsworth (15) determinaram o padrão completo de inibição,

por produtos para a L-malato desidrogenase mitocondrial de coração bovino, evitando concentrações nas quais as anomalias cinéticas, inibição ou ativação por substrato, tem lugar. Estas anomalias, porém, serão necessariamente detectadas em estudos de inibição por produto, caso se utilize concentrações nas quais ditas anomalias se tornam significativas. A equação de *steady-state* do mecanismo I, na presença de L-malato e ausência de NAD^+ , na forma duplamente recíproca, pode ser escrita (29):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_a}{V_1} \left[1 + \frac{K_{ia}K_b}{K_aB} \left(1 + \frac{K_qP}{K_{iiqKp}} \right) \right] \frac{1}{A} + \frac{1}{V_1} \left[1 + \frac{P}{K_{ip}} + \frac{K_b}{B} \left(1 + \frac{K_qP}{K_{iiqKp}} \right) \right] \quad (17)$$

ou

$$\frac{1}{v} = \frac{K_b}{V_1} \left(1 + \frac{K_{ia}}{A} \right) \left(1 + \frac{K_qP}{K_{iiqKp}} \right) \frac{1}{B} + \frac{1}{V_1} \left(1 + \frac{K_a}{A} + \frac{P}{K_{ip}} \right) \quad (18)$$

As equações (17) e (18) mostram que qualquer que seja o substrato variável, NADH ou oxaloacetato, a inibição por L-malato deverá ser sempre não-competitiva. Que isto realmente ocorre pode ser visto nas figuras 11 e 22 e também em Heyde & Ainsworth (15). Da equação (17) pode-se tirar as seguintes relações:

$$\text{inclinação}_4 = \left(\frac{K_a}{V_1} + \frac{K_{ia}K_b}{BV_1} \right) + \left(\frac{K_{ia}K_b}{VB} \right) \left(\frac{K_q}{K_{iiqKp}} \right) P \quad (19)$$

e

$$\text{intersecção}_4 = \left(\frac{1}{V_1} + \frac{K_b}{V_1B} \right) + \left(\frac{1}{V_1K_{ip}} + \frac{K_bK_q}{V_1K_{iiqKp}} \right) P \quad (20)$$

Similarmente, da equação (18) pode-se ver que:

$$\text{inclinação}_5 = \left(\frac{K_b}{V_1} + \frac{K_{ia}K_b}{V_1A} \right) + \left(\frac{K_b}{V_1} + \frac{K_{ia}K_b}{V_1A} \right) \left(\frac{K_q}{K_{iiqKp}} \right) P \quad (21)$$

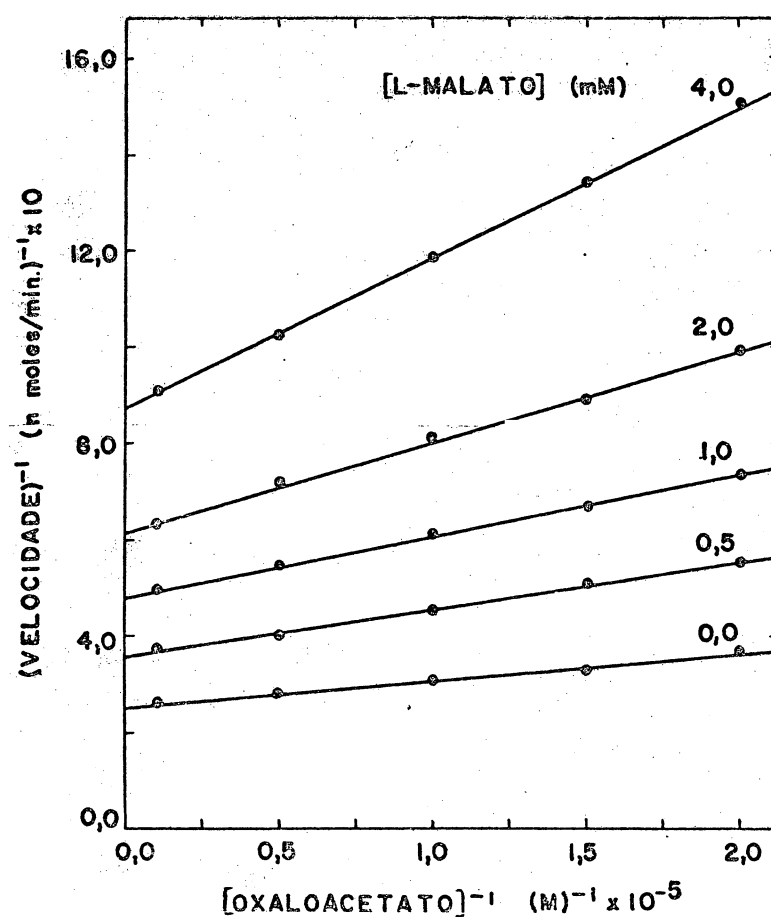


Figura 12. Inverso da velocidade *versus* o inverso da concentração de oxaloacetato a diferentes concentrações de L-malato. A concentração de NADH foi mantida constante e igual a 100 μM . As curvas representam o ajuste ponderado de mínimos quadrados à equação da reta. Todos os dados foram obtidos a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em tampão tris-acetato pH 8,0 e 0,05 M em acetato. Outros detalhes experimentais podem ser encontrados em *Materiais e Métodos*.

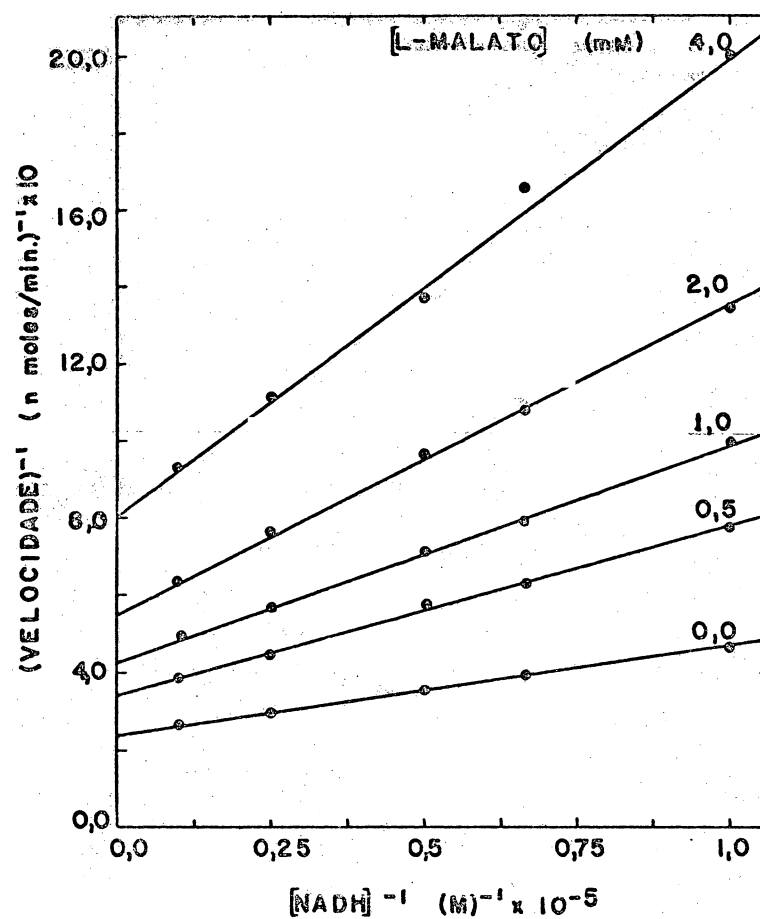


Figura 11. Inverso da velocidade inicial *versus* o inverso da concentração de NADH a diferentes concentrações de L-malato. A concentração de oxaloacetato foi mantida constante e igual a 100 μ M. As curvas representam o ajuste ponderado de mínimos quadrados à equação da reta. Todos os dados foram obtidos a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em tampão tris-acetato pH 8,0 e 0,05 M em acetato. Outros detalhes experimentais podem ser obtidos em *Materiais e Métodos*.

e

$$\text{intersecções} = \left(\frac{1}{V_1} + \frac{K_a}{V_1 A} \right) + \frac{P}{K_{ip}} \quad (22)$$

O que as relações (19) a (22) revelam é que as inclinações e as intersecções ao eixo das ordenadas das experiências das figuras 11 e 12 deveriam ser funções lineares da concentração de L-malato e caso o mecanismo I (ou também o mecanismo II) fosse inteiramente válido, para qualquer concentração de L-malato. Os dados experimentais no entanto revelam-se inconsistentes com as previsões feitas. Com efeito, um exame das figuras 13 e 14 revela que em ambos os casos a inclinação e a intersecção não são funções lineares da concentração de L-malato. Na realidade, as curvas das figuras 13 e 14, revelaram-se hipérbolas do tipo (28),

$$\text{intersecção ou inclinação} = \frac{a + bP}{1 + cP}, \quad (23)$$

o que foi constatado por uma análise estatística.

Os desvios da linearidade eram realmente esperados, porém, apenas em concentrações mais elevadas do que aquelas utilizadas nas experiências das figuras 11 e 22 já que Heyde & Ainsworth (15) declaram que as relações do tipo daquelas das figuras 13 e 14 são lineares para concentrações não muito diferentes de L-malato que as utilizadas aqui. Ocorre que a preparação enzimática utilizada no presente trabalho, proporcionou valores para as diversas constantes cinéticas, sempre menores que as reportadas por Heyde & Ainsworth (15), fato que explica o aparecimento das anomalias devidas ao L-malato em concentrações mais baixas que as esperadas. As diferenças devem-se possivelmente a diferenças no processo de purificação da enzima, pois esta é realmente muito influenciada pelos métodos de extração e purificação. No presente trabalho, não foi omitido o tratamento pelo calor introduzido por Englard & Siegel (7) nas últimas etapas de purificação, o que foi omitido por Heyde

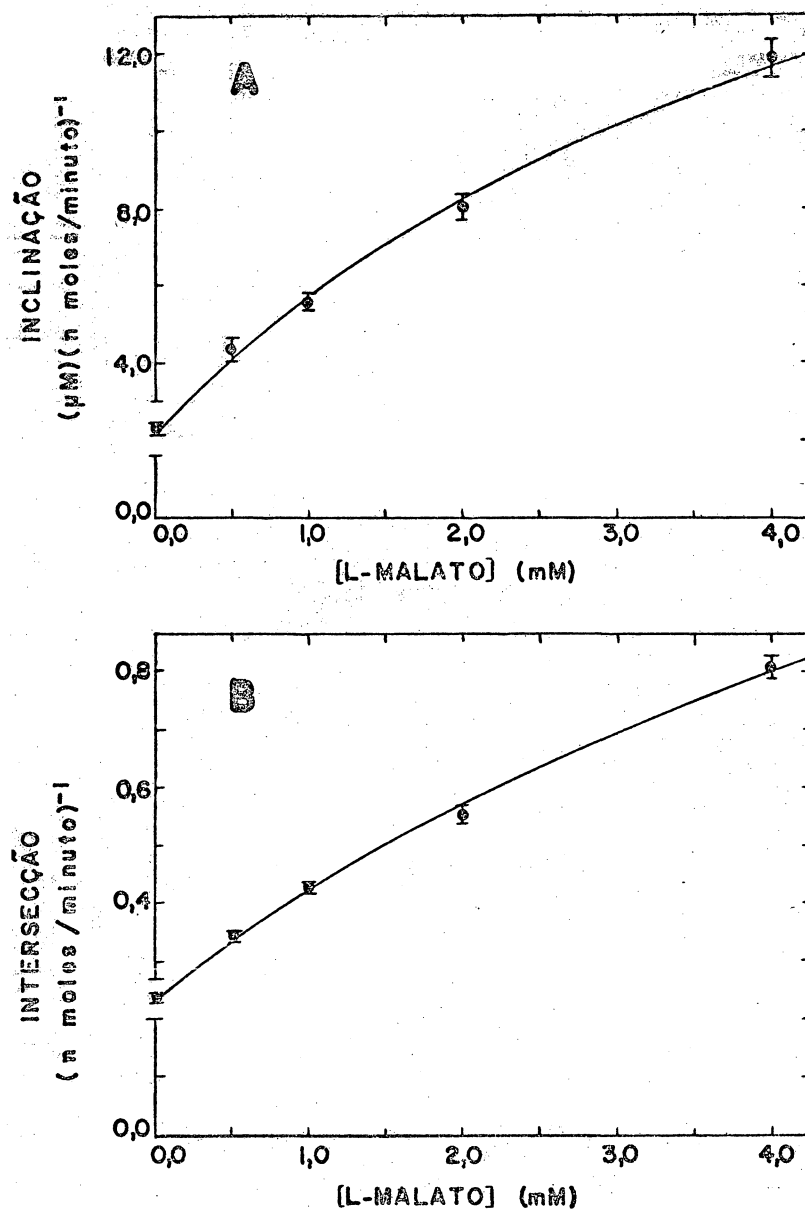


Figura 13. Inclinações (A) e intersecções ao eixo das ordenadas (B) obtidos da figura 11 *versus* a concentração de L-malato. Os pontos representam inclinações ou intersecções e as barras os respectivos erros padrões obtidos pelo ajuste de mínimos quadrados à equação da reta das curvas da figura 11. As curvas traçadas nos gráficos A e B representam o ajuste ponderado de mínimos quadrados dos dados à equação (23).

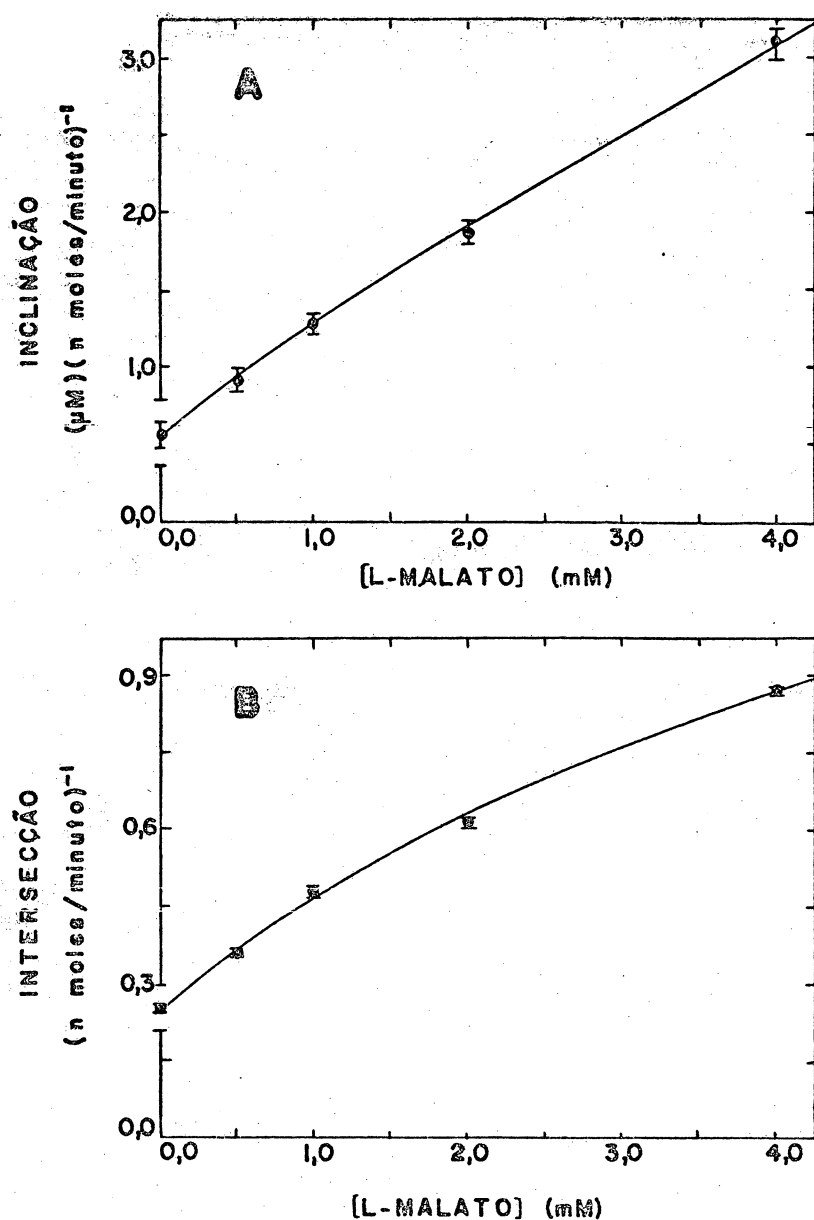


Figura 14. Inclinações (A) e intersecções ao eixo das ordenadas (B) obtidos da figura 12 *versus* a concentração de L-malato. Os pontos representam inclinações ou intersecções e as barras os respectivos erros padrões obtidos pelo ajuste ponderado de mínimos quadrados à equação da reta das curvas da figura 12. As curvas traçadas nos gráficos A e B representam o ajuste ponderado de mínimos quadrados à equação (23).

& Ainsworth (15). Outra diferença reside no fato de que no presente trabalho o ponto de partida para o processo de purificação foi pó cetônico mitocondrial enquanto que na metodologia utilizada por Heyde & Ainsworth (15) o ponto de partida foi pó cetônico de coração inteiro. Aparentemente estas são as únicas causas que se poderia apontar para explicar tais diferenças de comportamento.

Como demonstra Cleland (28, 40), a inibição hiperbólica surge sempre que há vias alternativas que levam à formação de produtos. Isto pode ser constatado, elaborando-se mecanismos hipotéticos com vias alternativas e derivando as equações correspondentes. Fenômeno semelhante ao aqui mostrado foi constatado por Wratten & Cleland (43) em trabalho realizado com a álcool desidrogenase. Porém, no caso da álcool desidrogenase, a curvatura observada nos gráficos secundários tinha a concavidade voltada para cima e os autores interpretaram-na como sendo uma função 2/1 (equação 5). O significado geral é no entanto o mesmo que o especificado acima para a equação (23), isto é, deve haver vias alternativas que levam à formação de produtos, o que foi posteriormente demonstrado pelos mesmos autores (44). O aparecimento em tais instâncias de uma relação hiperbólica como a equação (23) ou de uma função 2/1, tem pois o mesmo significado básico, diferindo apenas em detalhes e no grau de complexidade. A função 2/1, dependendo dos valores relativos das constantes, pode apresentar uma curvatura com a concavidade voltada para cima ou para baixo ou ainda apresentar uma relação linear aparente. No caso das curvas das figuras 13 e 14, pelo menos a do gráfico A da figura 14, pareceria à primeira vista, muito mais semelhante às curvas teóricas para a função 2/1 encontradas na literatura (37) do que realmente uma hipérbole do tipo da equação (23). Para excluir ou confirmar esta possibilidade, fez-se também um ajuste de mínimos quadrados de todos os dados das figuras 13 e 14, à função 2/1,

$$\text{intersecção ou inclinação} = \frac{a + bP + cP^2}{1 + dP} . \quad (24)$$

Os resultados obtidos revelaram-se favoráveis à equação (23) como

a que melhor descreve as curvas das figuras 13 e 14. Com efeito, o teste F de Snedecor de significância registrou uma probabilidade de 99% para todas as curvas, no caso do ajuste à equação (23). Para o ajuste à equação (24) as probabilidades reveladas pelo mesmo teste de significância foram de 90% para a curva do gráfico A da figura 13, 90% para a curva do gráfico B da figura 13, 95% para a curva do gráfico A da figura 14 e 90% para a curva do gráfico B da figura 14. O ajuste dos dados dos gráficos A e B da figura 14 à função 2/1 revelou além do mais o aparecimento de constantes negativas, as quais tem significado extremamente duvidoso em cinética de *steady-state*.

As curvaturas do tipo das observadas nos gráficos 13 e 14, podem ser bem pouco pronunciadas às vezes e passar despercebidas, principalmente quando não são esperadas. A curva do gráfico A da figura 14, particularmente, pode ser facilmente interpretada como uma relação linear, principalmente caso se exclua o ponto correspondente à concentração zero de L-malato. Sem uma análise estatística uma curvatura deste tipo não pode ser distinguida com clareza.

Os gráficos B das figuras 13 e 14 mostram em última análise, a variação do inverso das velocidades máximas aparentes da reação com a concentração de L-malato como inibidor. No caso da figura 13, as velocidades máximas aparentes são função da concentração de oxaloacetato e na figura 14, são função da concentração de NADH. Se a relação que descreve as curvas for realmente a equação (23), a posse das constantes da hipérbole de regressão, avaliadas pelo ajuste de mínimos quadrados, permite calcular as velocidades máximas aparentes correspondentes a uma concentração saturante de L-malato, e compará-las com as velocidades máximas aparentes medidas na ausência de L-malato. Em ambos os casos verificou-se que as velocidades máximas aparentes a uma concentração saturante de L-malato correspondem a mais ou menos 13% daquelas verificadas na ausência de L-malato. Portanto, L-malato não produz inibição completa, mesmo a concentrações saturantes, sendo que o máximo de inibição que pode haver, parece situar-se em torno de 87%. Isto sugere que a via alternativa que leva à formação de produtos e que não consta do

mecanismo I, é responsável por cerca de 13% do produto formado na unidade de tempo. Um certo cuidado deve ser tomado em interpretar os resultados desta forma, pois interpretações alternativas poderiam ser encontradas.

Pode-se arguir também que o efeito anômalo observado na inibição de produto pelo L-malato, pode ser devido a uma ação inespecífica do aumento da força iônica causado pela introdução de concentrações relativamente elevadas de L-malato. Parece pouco provável este argumento pelos seguintes motivos: a) foram utilizadas concentrações iguais de oxaloacetato e maiores de NAD^+ , sem que se tenha verificado nenhum efeito devido a uma alteração significativa da força iônica do meio; b) em experiências nas quais se manteve fixa a concentração dos substratos e nas quais se duplicou a concentração do tampão, com isto duplicando também a força iônica, um gráfico do inverso da velocidade contra a concentração de L-malato não deixou de mostrar a mesma curvatura; c) como se verá adiante, o aumento da força iônica com íons orgânicos não afeta a atividade na faixa que vai de 0,05 a 0,1 M de modo significativo. Todos estes argumentos reforçam em muito a suposição de que o efeito anômalo seja específico para L-malato, o que não invalida a suposição de que um composto semelhante possa produzi-lo também.

De certa forma, a curvatura detectada nas figuras 13 e 14, é exatamente o que se esperaria obter em vista do que se conhece sobre a ativação por substrato causada por altas concentrações de L-malato (6). Neste sentido também, estes dados não concordam com a existência de um complexo inibitório enzima-NADH-L-malato, apontada por Silverstein & Sulebele (41). Se este complexo existisse, a inibição de produto pelo L-malato não deveria ser nem linear e nem hiperbólica, mas sim parabólica. Como mostra Cleland (40), a inibição deveria ser inclinação-linear intersecção-parabólica não-competitiva com NADH como substrato variável e inclinação-parabólica intersecção-linear não-competitiva com oxaloacetato como substrato variável.

Resultados semelhantes foram reportados por Frieden & Fernandez-

Souza (14) em trabalho realizado com a L-malato desidrogenase citoplasmática de coração de porco. Estes autores verificaram que não havia relação linear entre o inverso da velocidade de reação e a concentração de L-malato como inibidor. Verificaram também, haver uma ativação por substrato causada por altas concentrações de L-malato, sendo os resultados, perfeitamente coerentes, também neste caso.

Das anomalias cinéticas estudadas neste trabalho, apenas a inibição de substrato por altas concentrações de oxaloacetato pode realmente ser enquadrada no mecanismo I. A inibição de substrato pelo NADH e o efeito anômalo causado pelo L-malato não podem ser facilmente enquadrados no mecanismo I. O fato de os dados referentes à inibição de substrato pelo oxaloacetato poderem ser enquadrados no mecanismo I, não significa naturalmente que este seja comprovadamente o caso pois mesmo neste trabalho, interpretações alternativas foram discutidas. Anomalias não enquadráveis no mecanismo I foram apontados também por Harada & Wolfe (45, 46) para a enzima mitocondrial de porco num estudo em que utilizaram hidroximalonato como inibidor. Também Frieden & Fernandez-Souza (14) apontaram várias anomalias cinéticas na enzima citoplasmática de coração de porco. Estes autores consideram que talvez o mecanismo I não seja uma representação adequada do mecanismo cinético não apenas da L-malato desidrogenase, como também de nenhuma desidrogenase. Se este for o caso, a cinética de *steady-state* dificilmente poderá apontar o mecanismo correto pois suas limitações são evidentes, principalmente quando se trata de averiguar isomerizações de complexos ternários ou alterações conformacionais induzidas pela ligação de coenzimas (14).

AÇÃO DA FÔRÇA IÔNICA SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA

O efeito da força iônica sobre a atividade da enzima está sumariado na figura 15. O efeito pode ser bastante complexo, porém, desde que duas condições limites sejam observadas, este efeito é de apenas um

tipo: a atividade sofre uma inibição por concentrações crescentes do eletrólito. Estas condições são: a) a concentração dos substratos deve estar abaixo da concentração na qual há inibição por substrato na força iônica mais baixa utilizada; b) os eletrólitos devem ser cátion e ânion monovalentes ou cátion divalente e ânion monovalente; se houver íons sulfato o padrão de dependência da força iônica torna-se mais complexo.

O efeito observado foi portanto inibitório quando se utilizou, a baixas concentrações de ambos os substratos, KCl (gráfico B da figura 15), $MgCl_2$ (gráfico A), $CaCl_2$ e LiCl (gráfico E), NaBr e tris-acetato (gráfico F), para aumentar a força iônica acima do valor mínimo de 0,05 M. O mesmo efeito foi observado quando se utilizou NaCl e KI, eletrólitos com os quais as atividades foram medidas às concentrações de 0,05 e 0,55 M apenas. No caso do KI, o efeito inibidor é muito mais pronunciado do que em qualquer dos casos da figura 15. Um aspecto digno de nota é revelado por um exame das curvas do gráfico E da figura 15. Neste gráfico, as forças iônicas idênticas correspondem concentrações diferentes dos eletrólitos LiCl e $CaCl_2$, sendo a concentração deste último bastante menor. No entanto, a atividade é deprimida da mesma forma, proporcionalmente à força iônica e não apenas à concentração do eletrólito. O mesmo pode ser verificado quando se compara a curva de dependência da força iônica na qual $MgCl_2$ (gráfico A, figura 15) foi utilizado com as demais nas quais ânions e cátions monovalentes foram utilizados. Na figura 16 isto pode ser melhor avaliado pois o gráfico apresenta a variação do inverso da velocidade de reação com a concentração de $MgCl_2$ e NaBr. Nota-se aí que em termos de concentração, o $MgCl_2$ é um inibidor muito mais eficiente. É difícil atribuir ao cátion ou ao ânion o papel ativo dos efeitos causados. Por exemplo, para concentrações idênticas de K^+ , a presença de I^- inibe muito mais a atividade do que o íon Cl^- . Porém, para concentrações iguais do íon Cl^- , a presença de Mg^{2+} exerce um efeito inibitório maior que o K^+ , mesmo que o Mg^{2+} esteja presente em concentrações menores que o K^+ . A análise isolada de cada caso, poderia levar à conclusão de que o ânion no primeiro caso e o cátion no segundo, seriam os responsáveis pelo efeito inibidor

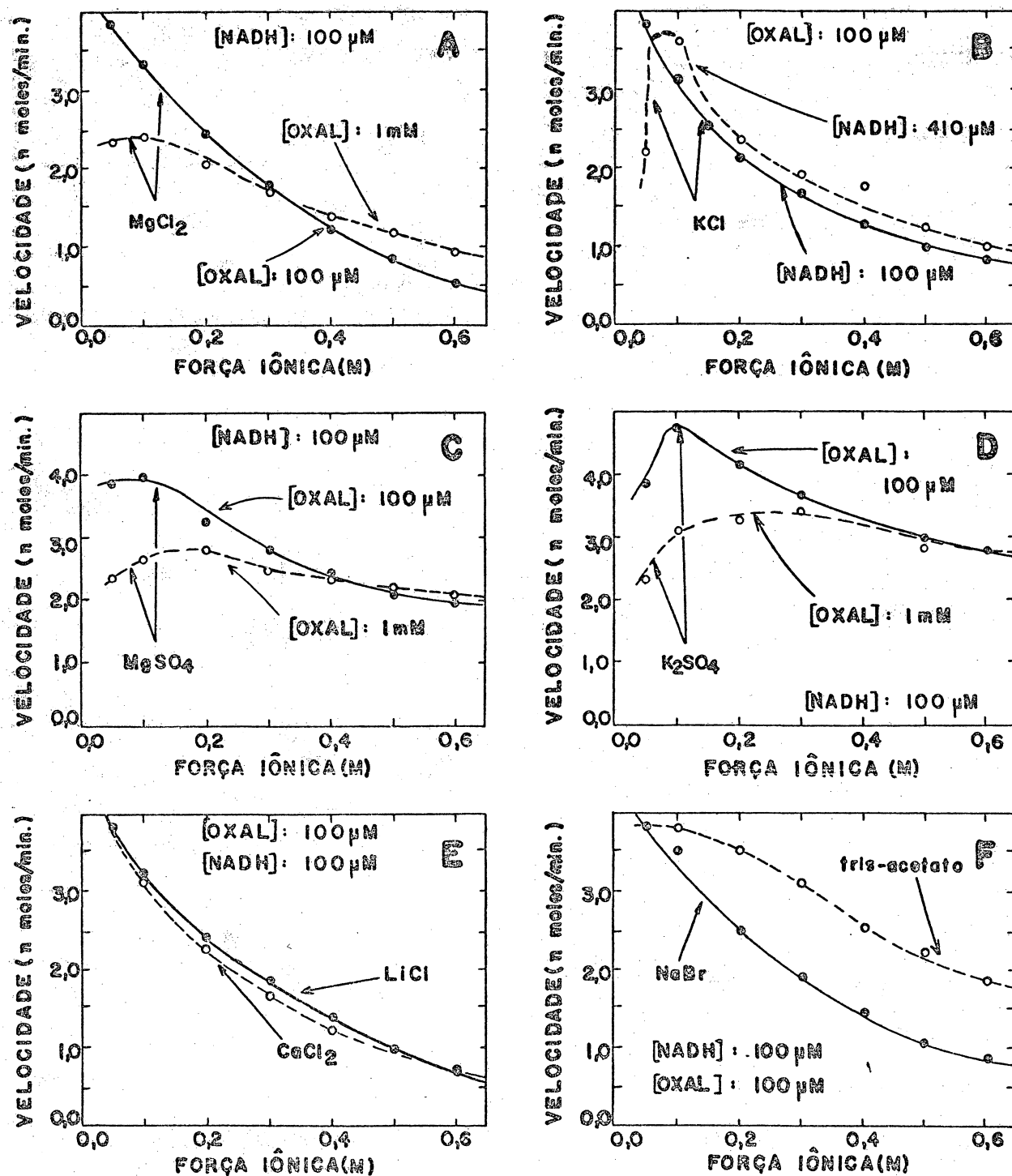


Figura 15. Série de gráficos da velocidade *versus* a força iônica em diferentes condições. Em cada gráfico estão indicadas as concentrações dos substratos para ambas ou para cada uma das curvas bem como o eletrólito utilizado para aumentar a força iônica acima do valor mínimo de $0,05 \text{ M}$. Todos os dados foram obtidos a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em tampão tris-acetato pH $8,0$ e $0,05 \text{ M}$ em acetato. Outros detalhes experimentais podem ser vistos em *Materiais e Métodos*.

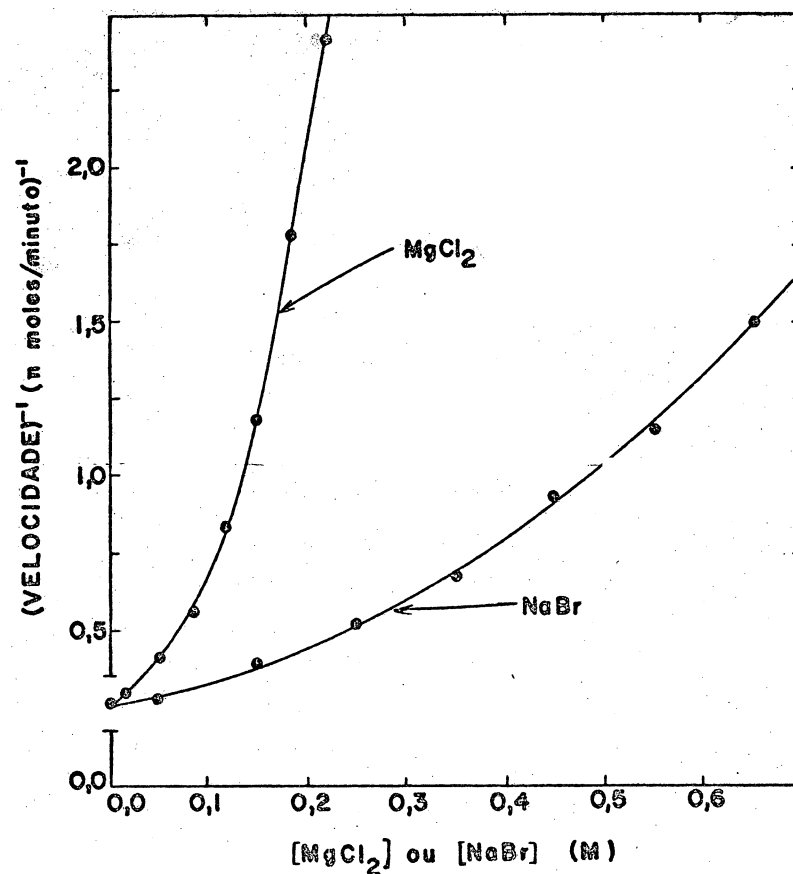


Figura 16. Inverso da velocidade de reação *versus* a concentração de MgCl_2 ou NaBr . As concentrações de NADH e oxaloacetato foram ambas iguais a $100 \mu\text{M}$. Todos os dados foram obtidos a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em tampão tris-acetato pH 8,0 e $0,05 \text{ M}$ em acetato. As curvas traçadas representam o ajuste ponderado de mínimos quadrados dos dados experimentais à equação (3). Maiores detalhes experimentais podem ser encontrados em *Materiais e Métodos*.

observado, desde que se assumisse ser a intensidade do efeito inibidor dependente da natureza do íon. Porém, uma análise global sugere que ambos, cátion e ânion, exercem determinados papéis no efeito observado embora não se possa precisar exatamente qual.

Quando a força iônica é aumentada com tris-acetato apenas, ocorre também inibição embora esta seja menos pronunciada e praticamente inexistente a forças iônicas baixas. Porém, parece ser do mesmo tipo que a provocada pela adição de eletrólitos inorgânicos pois um gráfico do inverso da velocidade de reação *versus* a concentração de tris-acetato, aparentemente, mostra o mesmo tipo de dependência, o que também foi confirmado por uma análise estatística.

Os gráficos C e D da figura 15 mostram que a introdução de um ânion divalente como o íon sulfato, leva a uma ativação inicial. A ativação é maior quando a concentração de sulfato é maior para uma dada força iônica, que é o que ocorre na curva do gráfico D em relação à do gráfico C. É razoável supor que a ativação é causada pelo sulfato, porém, se tomarmos os dados da figura 15 em conjunto, explicações alternativas podem ser fornecidas. No presente estudo, apenas eletrólitos fortes foram utilizados, à exceção de tris-acetato. Por isso, nenhum outro ânion divalente foi utilizado sistematicamente, mesmo porque parece claro, pelos resultados obtidos com sulfato, que estes introduzem complexidades adicionais ao sistema. O efeito ativador causado pelo sulfato é semelhante ao observado para a enzima mitocondrial de rim bovino com fosfato por Dupourque & Kun (26). Este último fenômeno foi também observado neste trabalho, ao se medir a atividade específica, a qual se revelou ser sempre maior em tampão fosfato. Este resultado sugere que possivelmente este efeito ativador seja causado por ânions divalentes em geral.

Como mostram os gráficos A e B da figura 15, quando a concentração de um dos substratos está dentro da faixa na qual há inibição por substrato na menor força iônica utilizada, a velocidade varia de maneira bem diferente com a força iônica. Quando se introduz oxaloacetato 1 mM

TABELA IV

Série de experiências para testar o efeito do tempo e a reversibilidade da inibição provocada por KCl. O sistema de incubação e o sistema de ensaio continham tampão tris-acetato pH 8,0 e 0,05 M em acetato. Em todas as experiências foram utilizadas quantidades constantes de enzima. A incubação foi feita a uma temperatura de $2-3^{\circ}\text{C}$ e o ensaio foi feito a $25,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Os dados de atividade consistem na média de dois experimentos. As concentrações de oxaloacetato e NADH foram ambas iguais a $100 \mu\text{M}$.

EXPERIÊNCIA Nº	INCUBAÇÃO		E N S A I O		
	[KCl] (M)	tempo (minutos)	[KCl] (M)	Atividade (n moles/minuto)	Porcentagem da atividade original
1	0,0000	0,0	0,0000	3,8452	100,0
2	0,0000	30,0	0,0000	3,8446	99,9
3	0,4445	30,0	0,4445	1,0508	27,3
4	0,4445	30,0	0,2223	1,7037	44,3
5	0,4445	0,0	0,4445	1,0192	26,5
6	0,2223	30,0	0,2223	1,7057	44,3
7	0,2223	0,0	0,2223	1,7279	44,9

(gráfico A da figura 15), o qual a uma força iônica igual a 0,05 M causa 40% de inibição, a atividade sofre uma pequena ativação inicial e uma pequena queda posterior com sucessivos aumentos na força iônica do meio. Porém, o resultado global é que a inibição relativa vai diminuindo progressivamente e a uma força iônica igual a 0,3 M passa a ser nula. Daí para diante a relação se inverte. A razão das velocidades com oxaloacetato 0,1 mM para oxaloacetato 1,0 mM passa de 0,6 a uma força iônica igual a 0,05 M para 1,6 quando a força iônica é igual a 0,6 M. Resultado semelhante foi observado por Kun *et al.* (18), com a enzima mitocondrial de rim de rato. O gráfico B da figura 15, mostra que algo semelhante ocorre em relação ao NADH. Quando se utiliza uma elevada concentração de NADH, 0,41 mM, na qual também ocorre inibição acentuada, a simples introdução de KCl faz com que esta inibição desapareça, embora a razão das velocidades em alta para baixa concentração de NADH não continue aumentando progressivamente como ocorre com o oxaloacetato. Estes fenômenos foram observados aqui com todos os eletrólitos testados, mesmo quando se introduziu íons sulfato. Neste último caso porém, como mostram os gráficos C e D da figura 15, o efeito é bem menos pronunciado e é tanto menos pronunciado quanto maior for a concentração de sulfato.

A ação dos eletrólitos sobre a atividade da enzima é independente do tempo de exposição da enzima à ação destes eletrólitos. Estas conclusões emergem do resultado dos experimentos da tabela IV. A inibição provocada por KCl é ainda a mesma após 30 minutos de incubação, tempo no qual não há inativação da enzima quando incubada com tampão tris-acetato. A estabilidade da enzima no tampão a 2-3°C é de várias horas, havendo, como é de se esperar, uma inativação após um tempo mais prolongado. A experiência número 4, da tabela IV, mostra também que é a força iônica do sistema de ensaio que determina a atividade, não importando a força iônica do meio em que se encontrava a enzima antes do ensaio, o que equivale a dizer que a ação de KCl é perfeitamente reversível. Na realidade, os dados da tabela IV provam apenas que o efeito independe do tempo durante os primeiros 30 minutos e não excluem a possibilidade de que quando as condições forem tais que permitam uma ina-

tivação em ritmo mais acelerado, a presença de eletrólitos não possa alterar este ritmo. Porém, é lícito concluir, que os dados experimentais obtidos neste trabalho, são apenas aqueles que dizem respeito aos efeitos reversíveis e praticamente instantâneos já que apenas medidas de velocidade inicial foram realizadas. Neste sentido, a ação de sais neutros sobre a L-malato desidrogenase difere marcadamente daquele observado por Kimenez *et al.* (47) com a aldolase. A ação dos eletrólitos sobre a aldolase revelou-se parcialmente irreversível e também dependente do tempo de exposição a uma força iônica elevada.

EFEITO DA FORÇA IÔNICA NAS CURVAS DE SATURAÇÃO DOS SUBSTRATOS

O que os gráficos A, B, C e D da figura 15 mostram, no tocante às altas concentrações de substratos, é apenas um reflexo das alterações que a força iônica pode provocar nas curvas de saturação de ambos os substratos. A diminuição da inibição relativa, é devida em grande parte a uma contínua migração da concentração ótima de substrato para valores progressivamente maiores quando se aumenta a força iônica. Isto pode ser visto com clareza nas figuras 5 e 9, onde se verifica que as concentrações ótimas de oxaloacetato e NADH são maiores a forças iônicas mais elevadas. O que as figuras 5 e 9 mostram também com clareza, é que em ambas as extremidades das curvas de saturação, eventos contrários tem lugar. A baixas concentrações dos substratos, a atividade é inibida, porém, a altas concentrações dos substratos, a tendência é a de haver um decréscimo da inibição, ainda que este decréscimo seja pouco pronunciado. No caso particular das curvas de saturação com oxaloacetato, pode-se dizer que não há alteração do tipo de dependência que para todas as forças iônicas experimentadas continua sendo descrita pela equação (11). O que ocorre simplesmente, é que ao lado de uma diminuição da velocidade máxima aparente (figura 24) há um aumento considerável, tanto da constante de Michaelis aparente (figura 26) como também da constante de inibição aparente, o que explica o efeito assimétrico em ambos os extremos das curvas de saturação. As constantes de inibição aparentes (equação 11), medidas para as forças iônicas 0,05; 0,2 e 0,4 M

foram, respectivamente, 1,25 mM, 1,64 mM e 3,89 mM. É possível que o mesmo ocorra com a curva de saturação de NADH, porém, como não foi encontrada nenhuma equação que a descreva, não se pode aqui afirmar se foi ou não alterado o tipo de dependência. Porém, também neste caso, a constante de Michaelis aparente sofre um aumento progressivo (figura 25), bem como ocorre uma diminuição no valor da velocidade máxima aparente (figura 24).

AÇÃO COMBINADA DA FORÇA IÔNICA E DO pH

A concentração de íons hidrogênio foi mantida constante na maioria dos estudos cinéticos deste trabalho. Porém, a rigor, o íon hidrogênio não deixa de ser um reagente da reação na direção oxaloacetato para L-malato, sendo portanto um produto da reação no sentido inverso (12). Esta constatação não exclui também uma participação de íons hidrogênio no ato catalítico ou na ligação dos substratos ao centro ativo, como ocorre com muitas enzimas (48, 50). Há realmente acentuadas semelhanças entre as curvas de dependência da velocidade de reação da atividade de íons hidrogênio e as curvas de saturação para com ambos os substratos. Isto pode ser apreciado na figura 17, na qual colocou-se a velocidade de reação contra o logaritmo positivo da atividade 10^{-10} M de íons hidrogênio, a fim de melhor ressaltar as semelhanças. As curvas da figura 17, cobrem uma variação de pH de 6,0 para 9,9 o que corresponde a atividades 10^{-6} M e $1,25 \times 10^{-10}$ M, respectivamente. Todos os pontos ressaltados em relação às curvas de saturação para oxaloacetato e NADH são válidos também para as curvas de dependência da atividade de íons hidrogênio: a) há um progressivo deslocamento para valores maiores da atividade (concentração) ótima à medida que se aumenta a força iônica; b) ocorre uma depressão da velocidade de reação a baixas atividades (concentrações) de íons hidrogênio; c) finalmente, há também um decréscimo da inibição a altas atividades (concentrações) a ponto de a curva correspondente à força iônica 0,2 M ter a pH 6,0 uma velocidade bem maior que a curva correspondente à força iônica igual a 0,05 M neste mesmo pH. A curva de dependência da velocidade do logaritmo da

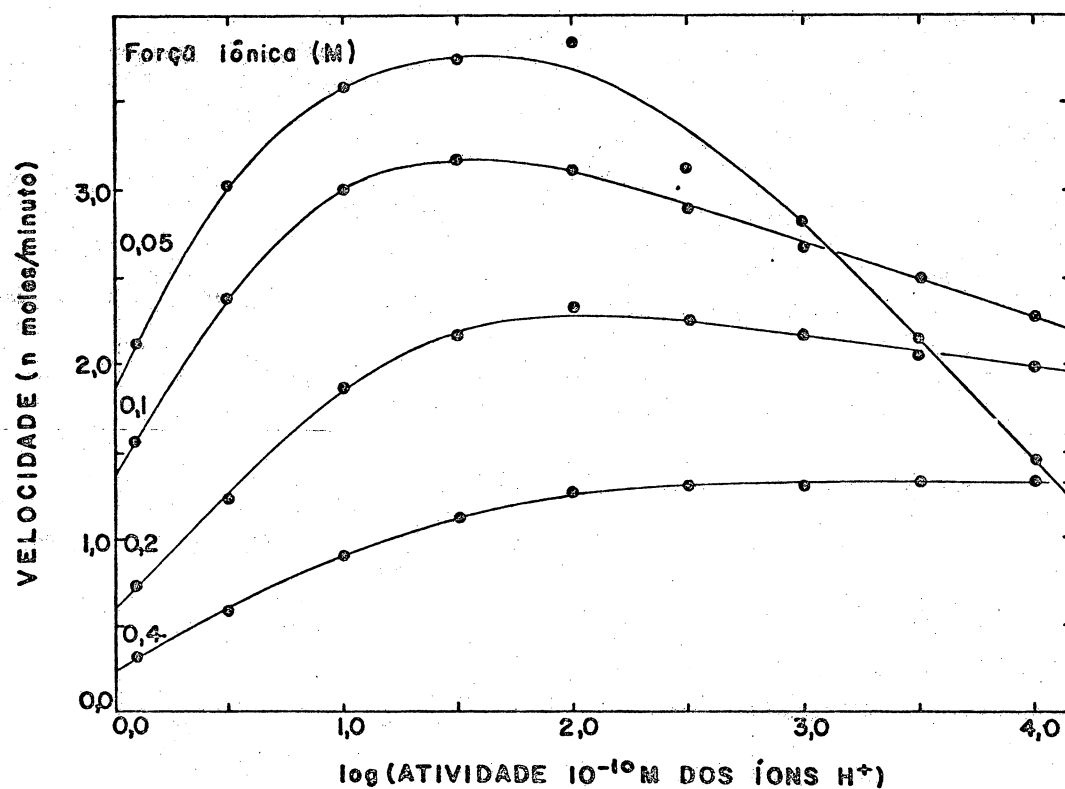


Figura 17. Velocidade de reação *versus* o logaritmo da atividade de íons hidrogênio a diferentes forças iônicas. As concentrações de NADH e oxaloacetato foram ambas iguais a 100 μ M. Todos os dados foram obtidos a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, em tampão tris-acetato, 0,05 M em acetato. Aumentos na força iônica acima de 0,05 M foram realizados adicionando-se KCl. Maiores detalhes experimentais podem ser obtidos em *Materiais e Métodos*.

atividade dos protons é assimétrica. Caso fosse descrita por uma equação semelhante à equação (11), seria perfeitamente simétrica, tal como ocorre com muitas enzimas (50). Esta assimetria é aliás acentuada à medida que se aumenta a força iônica.

Ao se analisar as curvas de saturação com oxaloacetato e NADH (figuras 5 e 9), verificou-se que a baixas concentrações de ambos, havia uma relação linear entre o inverso da velocidade e o inverso da concentração de oxaloacetato e NADH, concluindo-se que a cinética é do tipo Michaeliana a baixas concentrações de oxaloacetato e NADH (15). Isto implica também em que nestas baixas concentrações de ambos os substratos, é significativa apenas a ligação reversível dos substratos ao centro ativo da enzima para a formação de complexos que levam à formação de produtos. Ao se fazer um gráfico do inverso da velocidade de reação contra o inverso da atividade dos íons hidrogênio, verificou-se que há também uma relação linear deste tipo a baixas atividades (concentrações) de íons hidrogênio (entre pH 9,9 e 8,0) como o mostra claramente a figura 18. Por isso, a serem corretas as suposições feitas anteriormente em relação aos substratos, torna-se lícito concluir que as porções das curvas da figura 17 que vão de uma atividade zero a uma atividade 10^{-8} M de íons hidrogênio, descrevem determinado fenômeno relativo aos prótons, que também é o único significativo nesta faixa.

Naturalmente, como no caso do NADH e oxaloacetato, a dependência linear mencionada deve-se ao fato de haver na forma duplamente recíproca da equação de velocidade, um termo contendo o inverso da concentração de íons hidrogênio, o qual é o único significativo a baixas concentrações destes íons hidrogênio:

$$\frac{1}{v} = \frac{a}{H^+} + b \quad (25)$$

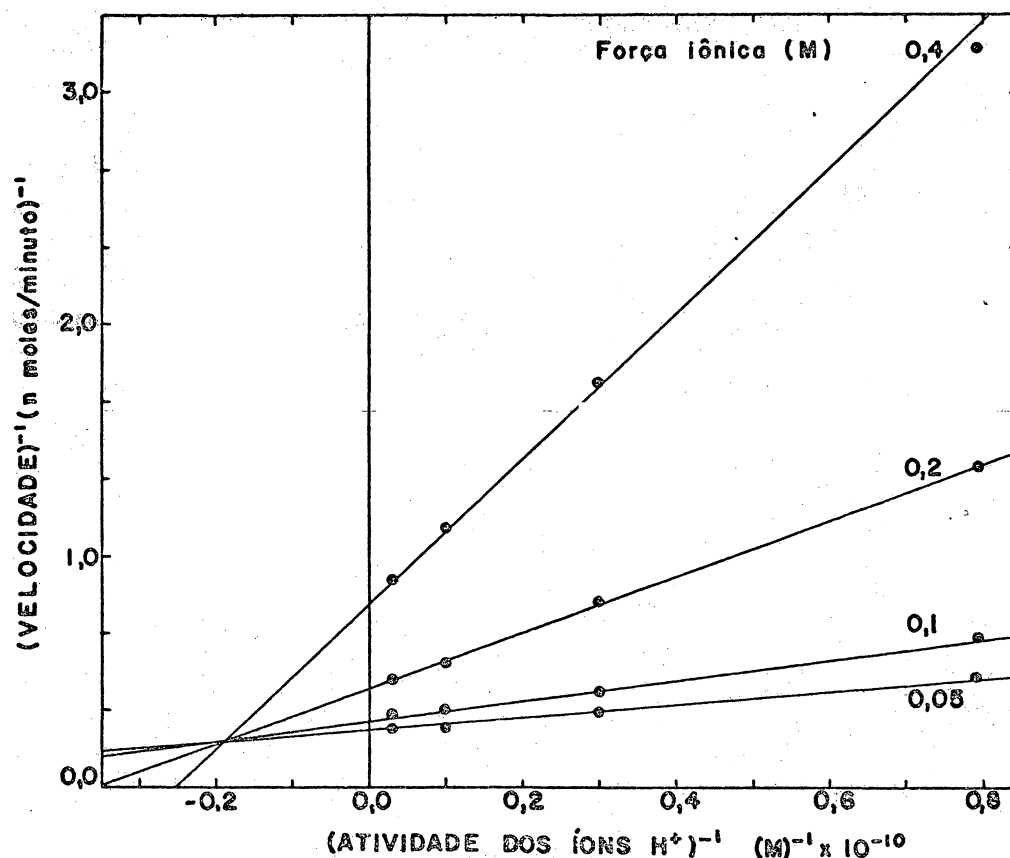


Figura 18. Inverso da velocidade inicial *versus* o inverso da atividade de íons hidrogênicos a diferentes forças iônicas do meio. A concentração de NADH foi igual a 100 μM . A concentração de oxaloacetato foi também igual a 100 μM . Todos os dados foram obtidos a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em tampão tris-acetato, 0,05 M em acetato. Aumentos na força iônica acima de 0,05 M foram feitos adicionando-se KCl. As curvas traçadas representam o ajuste ponderado de mínimos quadrados dos dados experimentais à equação da reta. Outros detalhes experimentais podem ser vistos em *Materiais e Métodos*.

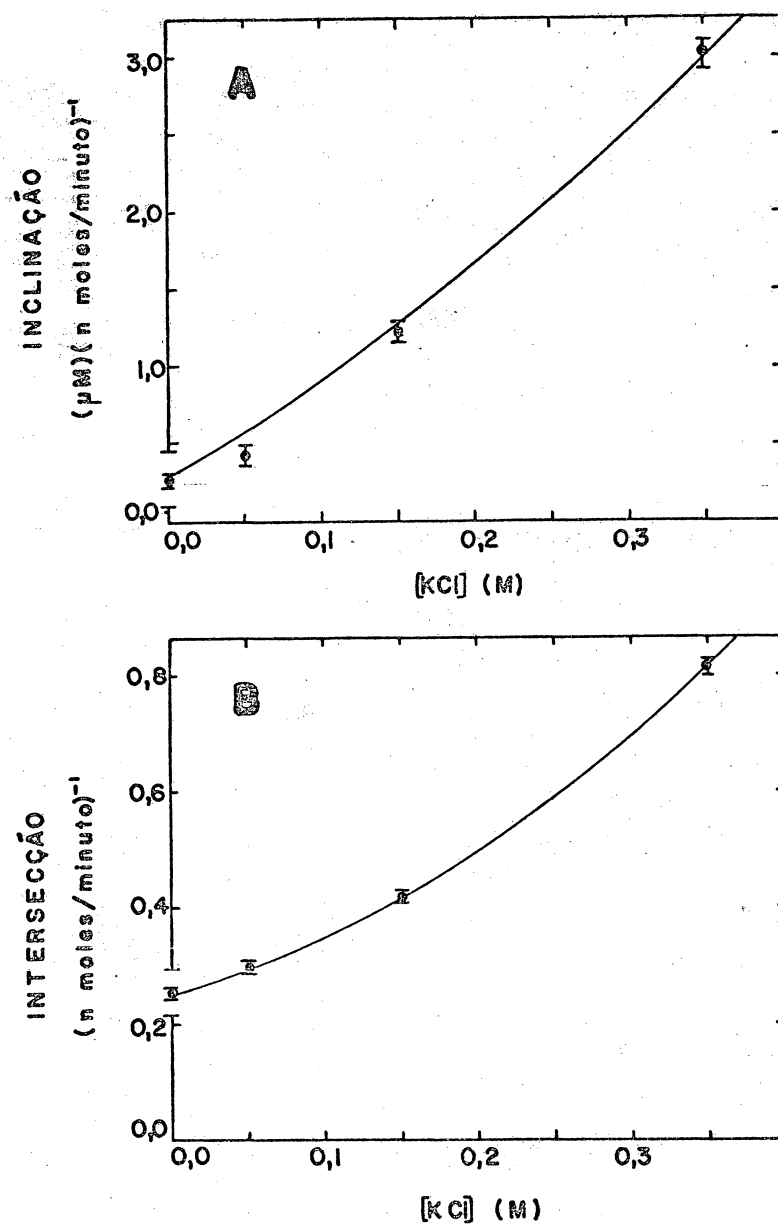


Figura 19. Inclinações (A) e intersecções ao eixo das ordenadas (B) obtidos da figura 18 *versus* a concentração de KCl. Os pontos representam inclinações ou intersecções e as barras os respectivos erros padrões obtidos pelo ajuste de mínimos quadrados à equação da reta das curvas da figura 18. As curvas traçadas nos gráficos A e B representam o ajuste ponderado de mínimos quadrados à equação (3).

Na equação (25), a e b são constantes, funções complexas de várias constantes cinéticas e também da concentração de NADH e oxaloacetato.

O que consta nas abcissas dos gráficos 17 e 18, é realmente a atividade dos íons hidrogênio, já que apenas esta pode ser medida pelo método usual (52). Há evidências teóricas e experimentais (33, 39, 53) que permitem concluir que o coeficiente de atividade dos íons hidrogênio já difere significativamente da unidade numa força iônica igual a 0,05 M. Também há evidências teóricas e experimentais (33, 39, 53) que permitem esperar, na faixa 0,05 a 0,4 M de força iônica, variações bem pouco pronunciadas no coeficiente de atividade dos íons hidrogênio. Sendo assim, nesta faixa de força iônica, a atividade medida dos íons hidrogênio, pode ser considerada como a concentração multiplicada por um fator essencialmente constante. De qualquer forma, não há dúvida que as medidas de atividade refletem muito de perto as concentrações reais dos íons hidrogênio e ao se fazer comparações relativas que envolvem grandes diferenças de concentração (ou atividade), ambos os termos, concentração e atividade, podem ser usados, indistintamente.

A equação (25) não passa de uma expressão limite de uma equação mais complexa, válida para altas e baixas concentrações dos íons hidrogênio. Esta expressão completa, deve rivalizar em complexidade com a equação que descreve a dependência da velocidade da concentração de NADH, ambas seguramente bem diferentes da equação (11) que descreve a curva de saturação completa com o oxaloacetato.

Uma comparação entre as figuras 15 e 17 revela que se as experiências constantes da figura 15 a baixas concentrações de ambos os substratos houvessem sido realizadas em altas concentrações de íons hidrogênio, pH 6,0 por exemplo, as curvas de dependência da velocidade de reação da força iônica, jamais seriam tão simples como as que foram observa

das. Haveria certamente um decréscimo da inibição; tal como ocorre também em altas concentrações dos substratos o que pode ser observado à direita do gráfico da figura 17. A dependência observada da atividade da enzima em relação à força iônica parece ser simples sempre que os eventos significativos que tem lugar no centro ativo sejam também simples. Quando as concentrações de oxaloacetato e NADH forem baixas, serão significativos apenas os eventos que conduzem à formação de complexos ativos os quais por sua vez, levam à formação de produtos. Consequentemente, o efeito da força iônica observado, poderá ser apenas aquele resultante das alterações que esta provoca naqueles eventos. Se outros eventos além daqueles são significativos, o que ocorre em altas concentrações de ambos os substratos, o efeito da força iônica observado, será a resultante de sua ação sobre eventos díspares e necessariamente mais complexo. Esta última constatação é também válida para altas concentrações de íons hidrogênio, já que, nestas condições, a participação dos protons, é visivelmente mais complexa.

AÇÃO DA FORÇA IÔNICA SOBRE OS PARÂMETROS CINÉTICOS.

Levando-se em conta que um considerável número de eletrólitos tem efeito inibidor a baixas concentrações dos substratos e que este efeito é reversível, torna-se lícita uma análise cinética destes efeitos, pelos mesmos métodos utilizados para os inibidores reversíveis em geral (28, 29), de acordo com uma das sugestões de Webb (39). As figuras 20 e 21 mostram o resultado de duas experiências deste tipo. Os gráficos revelam que KCl age como inibidor não-competitivo de ambos os substratos, oxaloacetato e NADH. Pode-se notar também que, intersecções e inclinações são funções idênticas da concentração de KCl, pois as linhas intersecetam num único ponto, acima do eixo das abcissas. Resultados do mesmo tipo foram observados para todas as concentrações dos substratos fixos testados. Nas figuras 22 e 23, podem ser apreciados os gráficos secundários de intersecções e inclinações em função da concentração de KCl. Todas as curvas mostram uma curvatura com a concavidade de voltada para cima. Na realidade as curvas das figuras 22 e 23 são descritas com grande precisão pela equação (3). A relação entre o inverso da velocidade e a força iônica (ou também a concentração do ele-

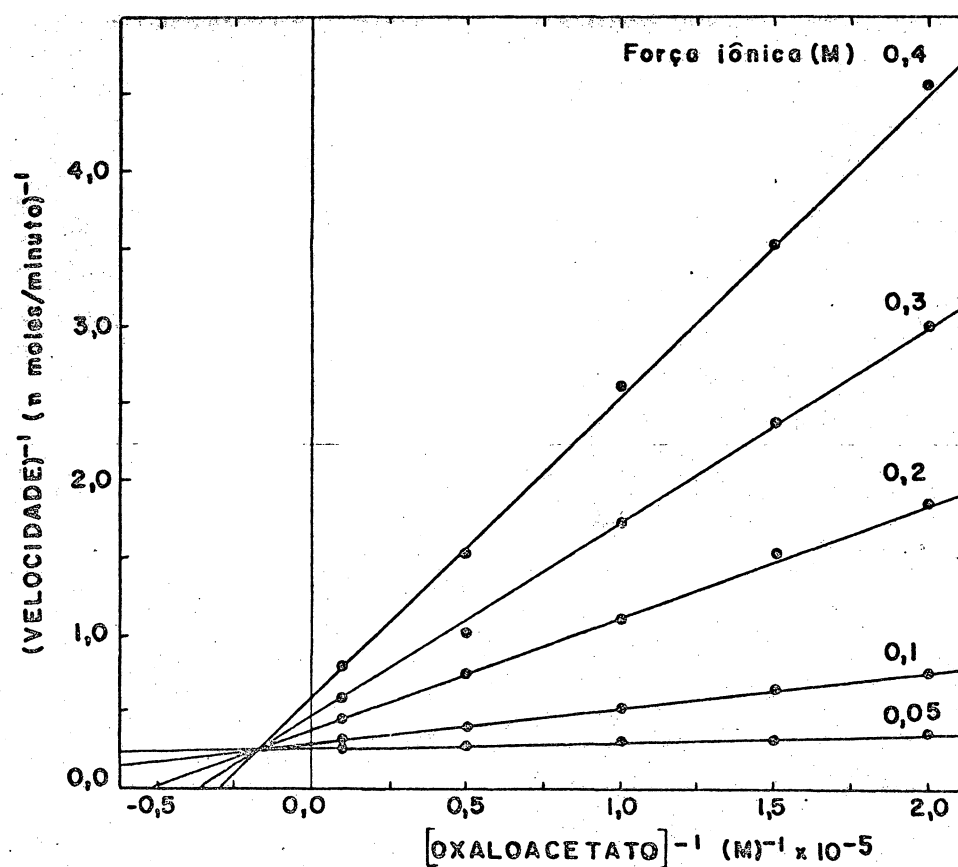


Figura 20. Inverso da velocidade inicial *versus* o inverso da concentração de oxaloacetato a diferentes forças iônicas do meio. A concentração de NADH foi mantida constante e igual a 100 μM . Todos os dados foram obtidos a $25,0 \pm 0,5$ $^{\circ}\text{C}$ em tampão tris-acetato pH 8,0 e 0,05 M em acetato. Aumentos na força iônica acima de 0,05 M foram feitos adicionando-se KCl. As curvas traçadas representam o ajuste ponderado de mínimos quadrados dos dados experimentais à equação da reta. Outros detalhes experimentais podem ser vistos em *Materiais e Métodos*.

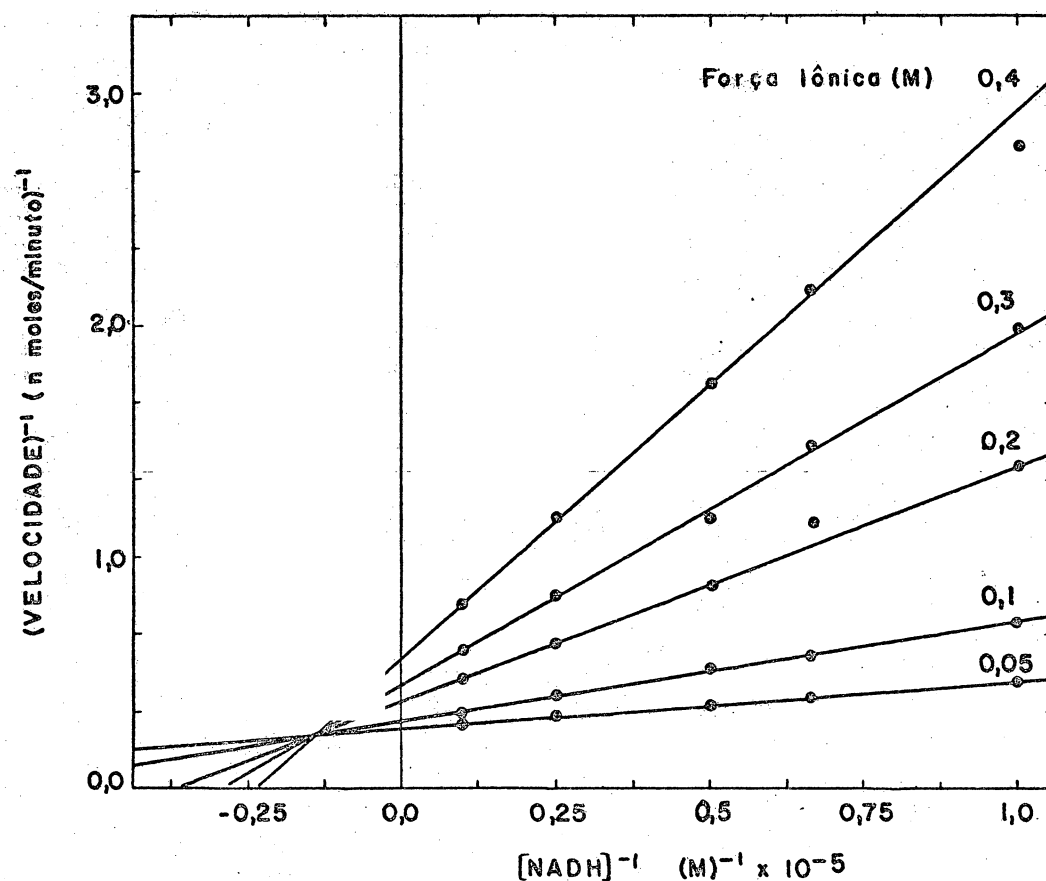


Figura 21. Inverso da velocidade inicial *versus* o inverso da concentração de NADH a diferentes forças iônicas do meio. A concentração de oxaloacetato foi mantida constante e igual a 100 μ M. Todos os dados foram obtidos a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em tampão tris-acetato pH 8,0 e 0,05 M em acetato. Aumentos na força iônica acima de 0,05 M foram feitos adicionando-se KCl. As curvas traçadas correspondem ao ajuste ponderado de mínimos quadrados dos dados experimentais à equação da reta. Outros detalhes experimentais podem ser vistos em *Materiais e Métodos*.

trólito) também é descrita, dentro dos limites utilizados, pela equação (3). Uma amostra disto pode ser vista na figura 16. O fato de a equação (3) descrever com precisão os dados experimentais não implica necessariamente que isto tenha algum significado teórico. Não se pode aqui encarar os eletrólitos apenas como inibidores comuns, os quais agem formando complexos abortivos (28), embora esta seja também uma das possibilidades. Por isso, a par de qualquer significado teórico que a equação (3) possa ter (28), esta é aqui utilizada mais como um apoio estatístico de grande utilidade prática, principalmente quando se trata de fazer extrapolações para diluição infinita dos eletrólitos (fôrça iônica zero), ou para obter outros dados. Mesmo porque, a equação (3) é apenas a relação mais simples que pode descrever os resultados dentro dos limites experimentais deste trabalho. A equação (5), por exemplo, pode descrever também com grande precisão todas as curvas das figuras 16, 22 e 23.

Uma possibilidade acerca do mecanismo de ação dos sais neutros que pode ser aventada é a de que os cátions seriam os responsáveis pelo efeito inibidor e competiriam com os prótons pelo sítio de ligação destes últimos, ou também, impediriam diretamente o acesso dos prótons ao seu sítio de ligação. Neste caso, extrapolação para concentrações infinitas (atividades infinitas) dos íons hidrogênio deveria eliminar este efeito inibidor. Em outras palavras, a inibição deveria ser competitiva em relação aos prótons. A figura 18 mostra que a inibição causada pelo KCl é também não-competitiva quando a atividade dos prótons é posta a variar. No entanto, uma comparação da figura 18 com as figuras 20 e 21 revela que mais uma vez se evidencia a semelhança apontada no efeito da fôrça iônica sobre a dependência da atividade da enzima da concentração de substratos de um lado e íons hidrogênio do outro lado. Além de a inibição ser também não-competitiva, as retas intersectam acima do eixo das abcissas, mostrando que também aí, intersecções e inclinações são afetadas de maneira idêntica. Como se pode ver nos gráficos secundários da figura 19, o tipo de dependência das intersecções e inclinações obtido quando se variou a atividade dos íons hidrogênio é também uma curva com a concavidade voltada para cima, idêntica à observada nas

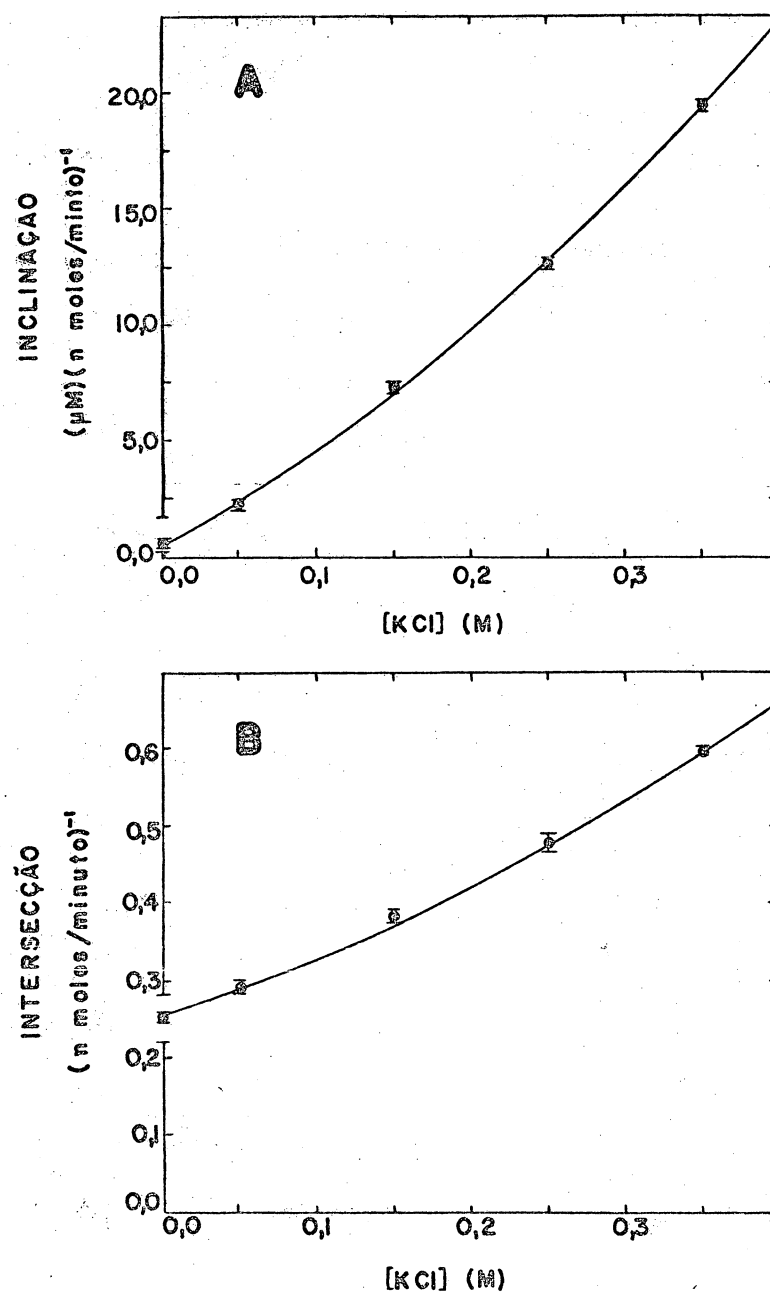


Figura 22. Inclinações (A) e intersecções (B) obtidos da figura 18 *versus* a concentração de KCl. Os pontos representam inclinações ou intersecções e as barras os respectivos erros padrões obtidos pelo ajuste ponderado de mínimos quadrados à equação da reta das curvas da figura 20. As curvas traçadas nos gráficos A e B representam o ajuste ponderado dos dados à equação (3).

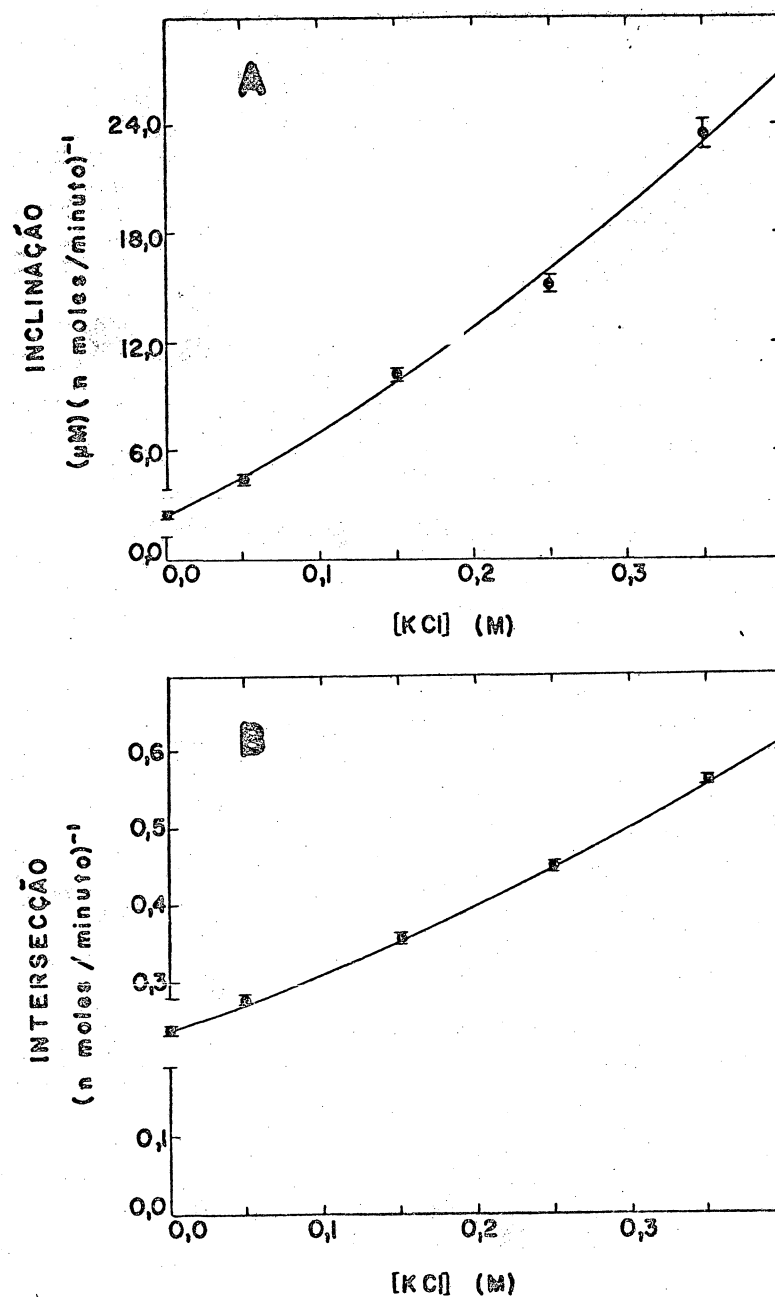


Figura 23. Inclinações (A) e intersecções ao eixo das ordenadas (B) obtidos da figura 21, *versus* a concentração de KCl. Os pontos representam inclinações ou intersecções e as barras os respectivos erros padrões obtidos pelo ajuste ponderado de mínimos quadrados à equação da reta das curvas da figura 19. As curvas traçadas nos gráficos A e B representam o ajuste ponderado de mínimos quadrados dos dados à equação (3).

figuras 22 e 23.

Parece lógico excluir-se a competição de cátions com os íons hidrogênio pelo mesmo sítio de ligação com base nos resultados expostos no parágrafo anterior. Porém, há possibilidades nas quais a inibição observada seria não-competitiva mesmo que este fenômeno ocorresse. Isto sucederia, por exemplo, caso tanto cátions como ânions exercessem um efeito inibidor independente. Neste caso, ainda haveria alteração da intersecção ao eixo das ordenadas, pois o efeito dos ânions não poderia ser eliminado pela extrapolação para condições saturantes dos íons hidrogênio. Porém, o efeito causado pelos ânions deveria ser de um tipo tal a originar o mesmo padrão de dependência de inclinações e intersecções, pois isto é o que foi observado experimentalmente (figura 19). O mesmo tipo de raciocínio pode ser empregado em relação à possibilidade de ânions agirem como competidores do NADH e oxaloacetato pelo sítio de ligação na enzima. Por isto, não é possível afirmar com absoluta certeza, com base nas inibições não-competitivas observadas, que não há competição com os substratos ou íons hidrogênio pelo sítio de ligação destes por parte dos eletrólitos, embora os resultados possam ser encarados como uma forte evidência desfavorável a esta interpretação.

Conforme já relatado no primeiro item, as constantes cinéticas da enzima foram avaliadas para várias forças iônicas, utilizando-se sempre KCl para aumentar a força iônica a partir de 0,05 M. Os resultados podem ser vistos nas figuras 24, 25 e 26.

A figura 24 mostra que tanto a velocidade máxima verdadeira, como também as velocidades máximas aparentes são alteradas. Pode-se ver também que a curvatura diminui à medida que se aumenta a concentração do substrato fixo, sendo mínima quando a concentração é saturante para ambos os substratos, o que ocorre com a curva correspondente à velocidade máxima verdadeira. Em si, as curvas da figura 24 podem parecer diferentes entre si, porém, o tipo de dependência é aparentemente o mesmo pois o inverso de cada parâmetro varia com a força iônica de acordo com a equação (3). Disto resulta claro que a força iônica afeta de forma

semelhante velocidade máxima verdadeira e as velocidades máximas aparentes.

As figuras 25 e 26 permitem ver que as constantes de Michaelis verdadeiras sofrem também uma variação pronunciada o mesmo ocorrendo com as constantes de Michaelis aparentes. As curvas são todas aparentemente do mesmo tipo o que indica que também neste caso os parâmetros aparentes variam de forma semelhante aos verdadeiros. A figura 25 mostra também a variação de K_{ia} com a força iônica. K_{ia} , caso seja válido o mecanismo I (ou II), o que parece razoável dentro de certas condições limites, é a constante de dissociação do complexo enzima-NADH. O que salta à vista é justamente a pequena variação que K_{ia} experimenta principalmente quando comparada com a grande variação que a constante de Michaelis verdadeira (K_a) do NADH sofre. Os dados relativos a K_{ia} apresentam uma certa dispersão, porém, há uma tendência em aumentar com valores crescentes da força iônica. A afinidade da enzima pelo NADH varia pois muito pouco, a ponto de a variação experimentada pela constante de dissociação não ter realmente efeito significativo na alteração da velocidade da reação. Isto pode ser constatado na tabela V, onde se confrontam velocidades teóricas, calculadas através da equação (6), utilizando as constantes cinéticas determinadas a diferentes forças iônicas com as velocidades medidas experimentalmente. Qualquer dos valores de K_{ia} utilizados resulta em velocidades teóricas que não diferem significativamente das demais e também das velocidades medidas experimentalmente. Isto implica em que se apenas variações na constante de dissociação do NADH tivessem lugar ao se variar a força iônica, estas variações dificilmente seriam detectadas caso fossem tão pequenas. Estes resultados vem em apoio a advertências contrárias às interpretações dadas comumente às variações observadas em sistemas enzimáticos nas constantes de Michaelis (48, 52). Constantes de Michaelis são comumente interpretadas como medidas de afinidade e suas variações como alterações desta afinidade. Porém, no presente caso, quando a constante de Michaelis do NADH aumentou em cinco vezes o seu valor original, a constante de dissociação, que é realmente uma medida direta da afinidade do NADH, não chega a duplicar o seu valor não conseguindo a sua va-

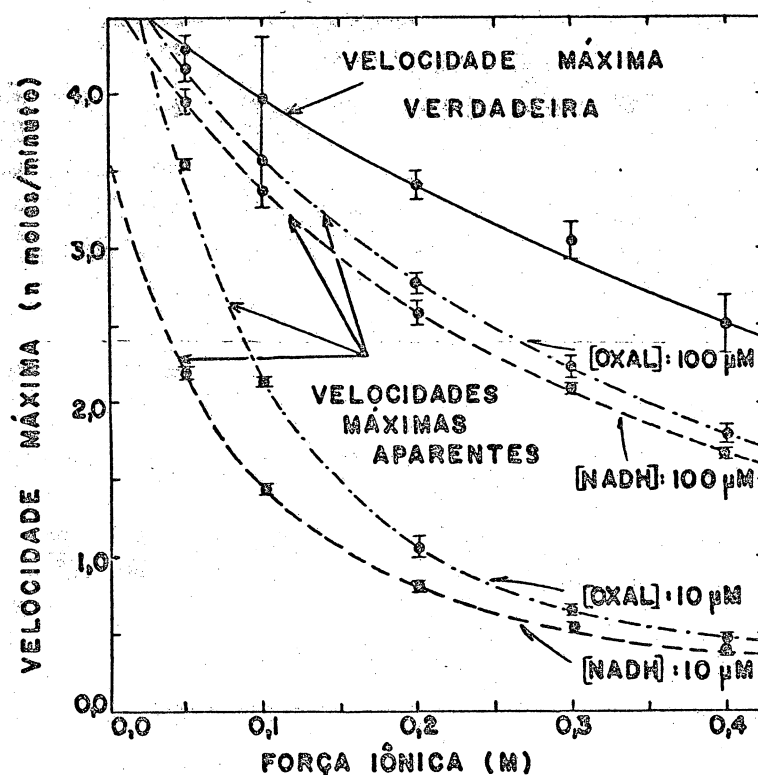


Figura 24. Variação das velocidades máximas em função da força iônica do meio. As velocidades máximas verdadeiras foram obtidas em experiências nas quais as concentrações de NADH e oxaloacetato foram variadas simultaneamente e representam as velocidades da reação catalizada pela enzima a concentrações saturantes de ambos os substratos. As velocidades máximas aparentes são funções da concentração de um dos substratos. As barras representam os erros padrões de cada dado experimental. Todos os dados foram obtidos a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em tampão tris acetato pH 8,0 e 0,05 M em acetato. Aumentos na força iônica acima de 0,05 M foram feitos adicionando-se KCl. Maiores detalhes experimentais podem ser vistos em *Materiais e Métodos*.

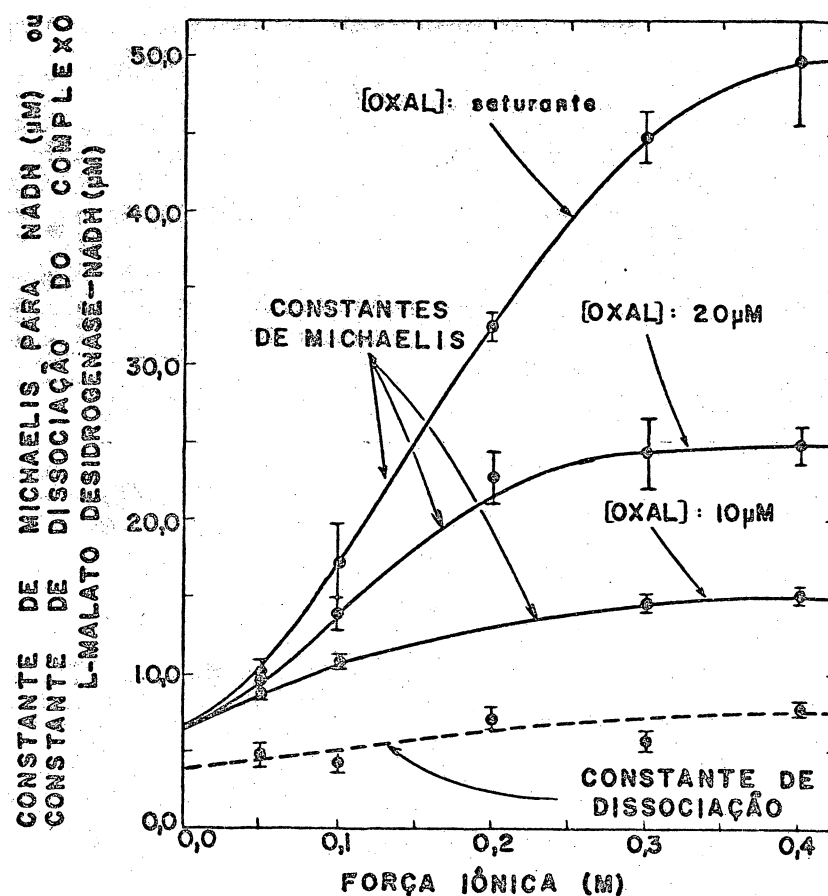


Figura 25. Variação das constantes de Michaelis do NADH e da constante de dissociação do complexo enzima-NADH em função da força iônica do meio. A constante de Michaelis verdadeira que corresponde a uma concentração saturante de oxaloacetato e a constante de dissociação do complexo enzima-NADH foram obtidas em experiências nas quais as concentrações de oxaloacetato e NADH variaram simultaneamente. As constantes de Michaelis aparentes foram obtidas em experiências nas quais se variou NADH a concentrações fixas de oxaloacetato. As barras representam os erros padrões. Todos os dados foram obtidos a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em tampão tris-acetato pH 8,0 e 0,05 M em acetato. Aumentos da força iônica acima de 0,05 M foram feitos adicionando-se KCl. Maiores detalhes experimentais podem ser encontrados em *Materiais e Métodos*.

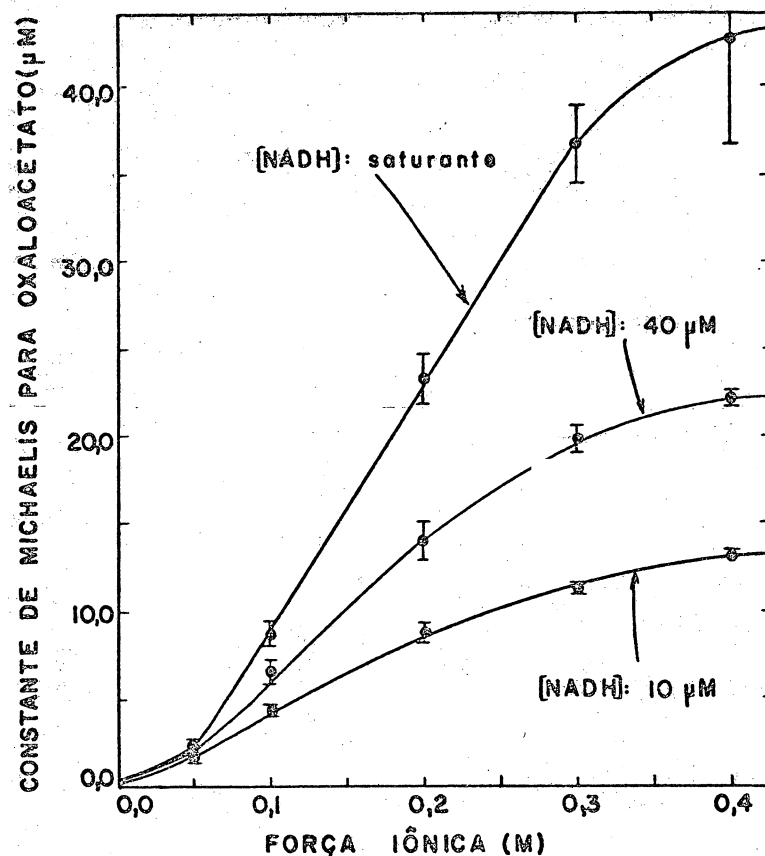


Figura 26. Variação das constantes de Michaelis do oxaloacetato em função da força iônica do meio. A constante de Michaelis verdadeira, que corresponde a uma concentração saturante de NADH foi obtida em experiências nas quais as concentrações de NADH e oxaloacetato variaram simultaneamente. As constantes de Michaelis aparentes foram obtidas em experiências nas quais se variou oxaloacetato a concentrações fixas de NADH. As barras representam erros padrões. Todos os dados foram obtidos a $25,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em tampão tris-acetato pH 8,0 e 0,05 M em acetato. Aumentos na força iônica acima de 0,05 M foram feitos adicionando-se KCl. Maiores detalhes experimentais podem ser encontrados em *Materiais e Métodos*.

TABELA V

Comparação entre valores de velocidades de reação experimentais e calculadas. Para o cálculo foram utilizadas a equação (6) e as constantes cinéticas V_1 , K_a e K_b determinadas experimentalmente. O valor de K_{ia} utilizado está indicado, bem como a força iônica para a qual foi determinado. As concentrações de NADH e oxaloacetato são ambas iguais a $10 \mu\text{M}$. Os dados experimentais foram todos obtidos a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em tampão tris-acetato pH 8,0 e 0,05 M em acetato. Aumentos na força iônica acima de 0,05 M foram feitos adicionando-se KCl.

FÔRÇA IÔNICA (M)	VELOCIDADE (nmoles/minuto)			
	Experimental	Calculada com $K_{ia} = 4,74 \mu\text{M}$ ($\mu = 0,05 \text{ M}$).	Calculada com $K_{ia} = 6,97 \mu\text{M}$ ($\mu = 0,2 \text{ M}$).	Calculada com $K_{ia} = 7,92 \mu\text{M}$ ($\mu = 0,4 \text{ M}$).
0,05	1,87	1,86	1,82	1,81
0,1	1,00	1,01	0,95	0,94
0,2	0,41	0,44	0,42	0,40
0,3	0,27	0,28	0,26	0,25
0,4	0,18	0,19	0,18	0,18

riação influir significativamente nas alterações da atividade. Que as constantes de Michaelis tem significado muito mais complexo, pode ser visto na tabela I. Na derivação da equação de velocidade para os mecanismos I e II, postulou-se apenas um complexo ternário, EAB, pois por cinética de *steady-state* não é possível distinguir isomerizações de complexos centrais, a não ser em certos casos especiais (40). Se porém, como parece lógico, existir pelo menos mais um complexo central, EPQ, além de EAB, o significado das constantes de Michaelis em termos de constantes de velocidade será ainda mais complexo do que aquele da tabela I e será tanto mais complexo, quanto maior for o número de complexos centrais. Logo, as constantes de Michaelis são constantes complexas que dizem respeito não apenas à ligação dos substratos à enzima como também incluem valores advindos do ato catalítico. Por isto, um agente qualquer que altere a velocidade do processo catalítico, deverá provocar uma variação na constante de Michaelis sem que necessariamente haja uma alteração na afinidade da enzima pelos substratos.

Embora a afinidade da enzima pelo NADH seja muito pouco alterada, o mesmo não sucede com a velocidade de combinação do NADH com a enzima. A tabela I revela que:

$$\frac{V_1}{K_a} = k_1 E_t \quad (26)$$

Como E_t é constante, pode-se calcular o decréscimo relativo de k_1 , a constante de velocidade de segunda ordem da combinação de NADH com a enzima. Quando a força iônica passa de 0,05 para 0,4 M, k_1 decresce 9,1 vezes. Para que K_{ia} , que é igual a k_2/k_1 aumente apenas 1,6 vezes o seu valor, k_2 , a constante de velocidade de primeira ordem para a decomposição do complexo enzima-NADH, deve também diminuir 5,5 vezes. Por aí percebe-se que a pequena alteração que sofre K_{ia} é na realidade essencialmente dependente das variações que sofrem k_1 e k_2 . Isto porque ao lado de um decréscimo na velocidade de combinação do NADH com a enzima, há também um decréscimo na velocidade de decomposição do complexo enzima-NADH em NADH e enzima livre.

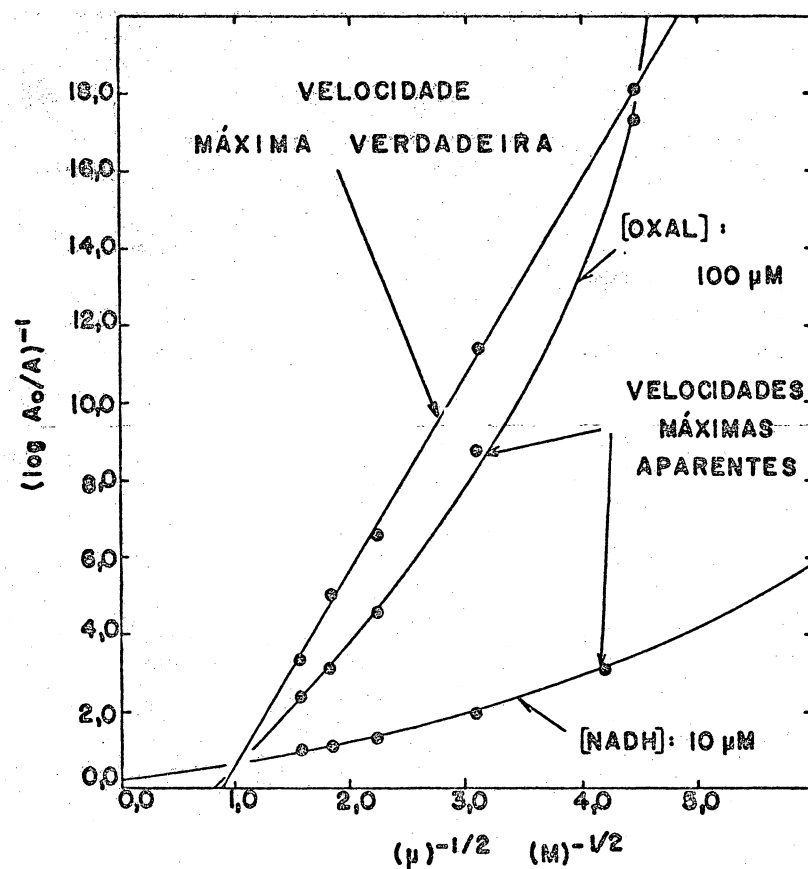


Figura 27. Logaritmo da razão entre a atividade da enzima a uma força iônica dada (A) e a atividade à uma força iônica igual a zero (A_0) versus o inverso da raiz quadrada da força iônica. Como medida da atividade foi utilizada a velocidade máxima verdadeira ou velocidades máximas aparentes, obtidas conforme explanado no texto. Os dados foram obtidos a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em tampão tris-acetato pH 8,0 e 0,05 M em acetato. Aumentos na força iônica acima de 0,05 M foram feitos adicionando-se KCl. Maiores detalhes experimentais podem ser encontrados em *Materiais e Métodos*.

A velocidade de reação na direção L-malato para oxaloacetato, também diminui quando se aumenta a força iônica. Neste sentido, o decréscimo em k_2 pode ter efeitos marcantes, se a decomposição do complexo enzima-NADH for a etapa determinante da velocidade. Também o decréscimo em k_1 , concorre para diminuir a velocidade de reação na direção oxaloacetato para L-malato, já que k_1 aparece no denominador da definição de K_a . Na realidade, o aumento que K_a experimenta, deve-se totalmente ao decréscimo em k_1 , já que $k_5k_7/(k_5 + k_7)$ decresce.

Alterações na força iônica são realmente alterações do ambiente que cerca a enzima e os substratos sem que haja a introdução de algo essencialmente novo no sistema, de vez que íons sempre existem, mesmo que sejam apenas os componentes do sistema tampão. Webb (39) relaciona as causas que podem levar as alterações do ambiente iônico a influir sobre a atividade de uma enzima. São elas: a) variações na propriedade dos solventes; b) variações nos coeficientes de atividade dos componentes do sistema; c) alterações nas propriedades da enzima ou nas propriedades dos reagentes; d) ligação específica dos íons à enzima. Apenas o item d parece improvável no que se refere à L-malato de desidrogenase, exceto em relação aos ânions divalentes. Os demais itens podem todos ser contados como possibilidades e não seria de surpreender que os resultados observados sejam a resultante do efeito combinado de todas as causas apontadas como possíveis.

Quantitativamente, apenas dois fatores podem ser testados com os dados obtidos no presente trabalho. Um dos fatores refere-se à variação de uma das propriedades do solvente, a água neste caso. Trata-se da constante dielétrica, a qual porém, de acordo com os cálculos apresentados por Webb (39) para as concentrações salinas aqui utilizadas foi muito pouco alterada a ponto de serem impossíveis testes quantitativos.

O segundo fator que pode ser testado quantitativamente refere-se

às variações nos coeficientes de atividade dos componentes do sistema (39). A força iônica provoca alterações nos coeficientes de atividade de eletrólitos e não-eletrólitos (33). Para os eletrólitos pode ser utilizada a relação entre o coeficiente de atividade iônico e a força iônica derivada por Debye-Hückel (54) e que na sua forma mais completa (55) pode ser escrita como:

$$\log \gamma = - \frac{Bz^2\sqrt{\mu}}{1 + C\sqrt{\mu}} + D\mu \quad (27)$$

Na equação (27), γ é o coeficiente de atividade, z a valência do íon e C e B são constantes complexas. D é uma constante e o termo $D\mu$, chamado termo "salificante" (33), foi introduzido para levar em conta a porção não-iônica da molécula. Webb (39) apresenta uma série de equações que descrevem a variação principalmente de constantes de dissociação (que são constantes de equilíbrio) ou de constantes de velocidade em função da força iônica, introduzindo atividades no lugar de concentrações. Neste trabalho, apenas uma constante de dissociação, K_{ia} , foi determinada a diferentes forças iônicas, sendo que não foi possível estabelecer nenhuma relação entre as pequenas variações aqui observadas e as fórmulas teóricas apresentadas por Webb (39).

Kistiakowski *et al.* (51), num estudo do efeito de eletrólitos sobre a atividade da urease, consideraram a razão entre a atividade (A) a uma força iônica μ e a atividade a uma força iônica zero (A_0) como um coeficiente de atividade:

$$\gamma = \frac{A}{A_0} \quad (28)$$

A atividade (A), para Kistiakowski *et al.* (51), foi simplesmente a velocidade da reação catalizada pela enzima. A justificativa de tal procedimento baseia-se na possibilidade de que uma espécie iônica poderia ser o fator determinante da velocidade (51). Kistiakowski *et al.* (51) utili-

zaram a equação de Debye-Hückel (54), sem o termo "salificante", o que é válido para baixas forças iônicas, modificada para,

$$\frac{1}{(\log A_0/A)} = \frac{1}{Bz^2} \frac{1}{\sqrt{\mu}} + \frac{C}{Bz^2}, \quad (29)$$

e mostraram haver uma relação linear entre $1/(\log A_0/A)$ e $1/\sqrt{\mu}$, exatamente como prevê a teoria. A fim de testar esta possibilidade, pouco frequente na literatura, utilizou-se no presente trabalho, as velocidades máximas como medidas da atividade sendo as velocidades máximas correspondentes à força iônica zero obtidas por extrapolação ao ajustar-se a variação do inverso destas velocidades máximas com a força iônica à equação (3). Os resultados estão na figura 27. Vê-se ali que realmente há uma relação linear perfeita, como prevista pela equação (29) quando se utiliza a velocidade máxima verdadeira, porém, nunca quando se utiliza velocidades máximas aparentes. Os resultados expostos na figura 27 devem ser interpretados com muita cautela. O principal problema advém da verificação de que a intersecção ao eixo das ordenadas, C/Bz^2 na equação (29), será negativa o que tem significado duvidoso ou ao menos revelaria alto grau de complexidade. Não se pode inclusive descartar a possibilidade de a linearidade observada ser devida ao acaso, hipótese que Kistiakowski *et al.* (51) também não descartaram. Outra possibilidade, naturalmente, é a de que a linearidade observada tenha realmente um significado. Webb (39) apresenta também relações, baseadas nos resultados obtidos por Brönsted & Livingstone (49) segundo as quais, constantes de velocidade poderiam variar de acordo com a lei de Debye-Hückel (54). A velocidade máxima verdadeira, no presente caso, é dada por (tabela I):

$$V_1 = \frac{k_5 k_7}{k_5 + k_7} E_t \quad (30)$$

Caso $k_5 \gg k_7$, $V_1 \approx k_7 E_t$; e, similarmente, caso $k_7 \gg k_5$, $V_1 \approx k_5 E_t$. No primeiro caso, a decomposição do complexo enzima-NAD⁺ seria a etapa

determinante da velocidade de reação e no último caso, a decomposição do complexo enzima-NAD⁺-L-malato em enzima-NAD⁺ mais L-malato é que seria a etapa determinante da velocidade. No primeiro caso, o que na equação (29) se chamou A_0/A seria na realidade igual a k_{07}/k_7 e no segundo caso seria igual a k_{05}/k_5 , onde k_{07} e k_{05} são os valores das constantes de velocidade a uma força iônica zero. A linearidade observada, poderia pois indicar, que uma constante de velocidade esteja variando com a força iônica de acordo com a lei de Debye-Hückel (54) e que a etapa determinante da velocidade de reação, envolve uma espécie iônica.

Dada a complexidade do problema, a interpretação acima, deve ser encarada apenas como uma possibilidade. Em termos mecanísticos, o raciocínio é válido apenas para as condições limites nas quais é também válido o mecanismo I (ou II). Neste sentido, porém, a não-linearidade observada na figura 27 quando se utilizou velocidades máximas aparentes poderia ser explicada, levando-se em conta que estas jamais podem refletir a variação de apenas uma constante de velocidade, já que, são iguais a, $V_1/(1+K_b/B)$ ou $V_1/(1+K_a/A)$, quando NADH ou oxaloacetato, respectivamente, são os substratos variáveis.

A sugestão de Kun *et al.* (18) que reservam um papel fisiológico à ação dos eletrólitos sobre a enzima mitocondrial, não pode ser respondida aqui. É difícil inclusive imaginar este papel de vez que comumente o que há é inibição da enzima, mesmo na direção L-malato para oxaloacetato, que é a direção fisiológica. Em todo caso, isto deverá ser examinado em condições realmente fisiológicas ou próximas disto, sendo necessário, além do mais, um melhor conhecimento da distribuição intra-mitocondrial dos eletrólitos.

CONCLUSÕES

Da discussão dos resultados obtidos neste trabalho, as seguintes conclusões podem ser relacionadas:

1. A inibição por substrato causada pelo oxaloacetato pode ser enquadrada no mecanismo de adição ordenada de dois substratos pela introdução adicional de dois complexos inativos.
2. A inibição por substrato pelo NADH e o efeito anômalo causado pelo L-malato não podem ser enquadrados de maneira simples no mecanismo de adição ordenada de dois substratos. Os resultados obtidos sugerem, principalmente no caso do L-malato, a existência de inibição incompleta o que pode indicar a existência de vias alternativas que levam à formação de produtos.
3. O efeito que a força iônica exerce sobre a atividade da enzima está intimamente associado aos eventos que ocorrem no centro ativo da enzima sendo tanto mais simples quanto mais simples forem aqueles eventos.
4. A força iônica tem um efeito assimétrico sobre ambas as extremidades das curvas de saturação dos substratos e das curvas de dependência da atividade da concentração dos íons hidrogênio.
5. A força iônica altera de modo pronunciado as constantes de Michaelis e a velocidade máxima, porém, pouco altera a afinidade do NADH pela enzima. No entanto a velocidade de combinação do NADH com a enzima é bastante afetada bem como a velocidade de decomposição do complexo enzima-NADH.

A P Ê N D I C E

São apresentadas aqui as fórmulas derivadas para os ajustes de mínimos quadrados (26, 27) às equações gerais (2) a (5). As fórmulas abaixo foram utilizadas para a elaboração dos programas Fortran.

EQUAÇÃO (2). Da equação (2),

$$y = a + bx + cx^{-1}$$

pode-se obter o seguinte sistema de equações, após o tratamento de mínimos quadrados:

$$a\sum w + b\sum wx + c\sum wx^{-1} - \sum wy = 0$$

$$a\sum xw + b\sum wx^2 + c\sum w - \sum wyx = 0$$

$$a\sum wx^{-1} + b\sum w + c\sum wx^{-2} - \sum wyx^{-1} = 0$$

w é o peso de cada dado experimental. As seguintes definições podem ser feitas:

$$C_1 = \sum wx \sum wy - \sum wyx \sum w$$

$$C_2 = \sum w \sum wx^2 - (\sum wx)^2$$

$$C_3 = (\sum w)^2 - \sum wx \sum wx^{-1}$$

$$C_4 = \sum wx^{-1} \sum wy - \sum w \sum wyx^{-1}$$

$$C_5 = \sum wx^{-2} \sum w - (\sum wx^{-1})^2$$

A partir das definições acima, as constantes podem ser calculadas:

$$c = \frac{C_1 C_3 - C_2 C_4}{C_2 C_5 - (C_3)^2}$$

$$b = \frac{-C_1 - c C_3}{C_2} = \frac{-C_4 - c C_5}{C_3}$$

e

$$a = \frac{\sum wy - b\sum wx - c\sum wx^2}{\sum w}$$

EQUAÇÃO (3). A equação da parábola,

$$y = a + bx + cx^2,$$

fornece após o tratamento de mínimos quadrados, o seguinte sistema de equações:

$$a\sum w + b\sum wx + c\sum wx^2 - \sum wy = 0$$

$$a\sum wx + b\sum wx^2 + c\sum wx^3 - \sum wxy = 0$$

$$a\sum wx^2 + b\sum wx^3 + c\sum wx^4 - \sum wxy^2 = 0$$

As seguintes definições podem ser feitas:

$$C_1 = \sum w\sum wx^3 - \sum wx^2\sum wx$$

$$C_2 = \sum w\sum wx^2 - (\sum wx)^2$$

$$C_3 = \sum wy\sum wx - \sum w\sum wyx$$

$$C_4 = \sum w\sum wx^4 - (\sum wx^2)^2$$

$$C_5 = \sum wy\sum wx^2 - \sum w\sum wyx^2$$

As constantes podem ser calculadas:

$$c = \frac{C_1C_3 - C_2C_5}{C_2C_4 - (C_1)^2},$$

$$b = \frac{-C_3 - cC_1}{C_2} = \frac{-C_5 - cC_4}{C_1}$$

e

$$a = \frac{\sum wy - c\sum wx^2 - b\sum wx}{\sum w}$$

EQUAÇÃO (4). A hipérbole quadrática,

$$y = \frac{a + bx}{1 + cx},$$

pode ser reescrita na forma,

$$y = a + bx - cyx,$$

mais apropriada para o tratamento de mínimos quadrados. Este tratamento fornece o seguinte sistema de equações:

$$a\sum w + b\sum wx - c\sum wyx - \sum wy = 0$$

$$a\sum wx + b\sum wx^2 - c\sum wyx^2 - \sum wyx = 0$$

$$\sum wy^2x + c\sum wy^2x^2 - a\sum wyx - b\sum wyx^2 = 0$$

As definições que podem ser feitas são:

$$C_1 = \sum wy\sum wx - \sum w\sum wyx$$

$$C_2 = \sum w\sum wx^2 - (\sum wx)^2$$

$$C_3 = \sum wyx\sum wx - \sum w\sum wyx^2$$

$$C_4 = \sum w\sum wy^2x - \sum wy\sum wyx$$

$$C_5 = \sum w\sum wy^2x^2 - (\sum wyx)^2$$

As constantes podem ser calculadas pelas relações abaixo:

$$c = \frac{C_1C_3 - C_2C_4}{C_2C_5 - (C_3)^2},$$

$$b = \frac{-C_1 - cC_3}{C_2}$$

e

$$a = \frac{\sum wy - b\sum wx + c\sum wyx}{\sum w}.$$

EQUAÇÃO (5). A função 2/1,

$$y = \frac{a + bx + cx^2}{1 + dx},$$

pode ser reescrita:

$$y = a + bx + cx^2 - dyx$$

O tratamento de mínimos quadrados da equação fornece:

$$a\sum w + b\sum wx + c\sum wx^2 - d\sum wyx - \sum wy = 0$$

$$a\sum wx + b\sum wx^2 + c\sum wx^3 - d\sum wyx^2 - \sum wyx = 0$$

$$a\sum wx^2 + b\sum wx^3 + c\sum wx^4 - d\sum wyx^3 - \sum wyx^2 = 0$$

$$-a\sum wyx - b\sum wyx^2 - c\sum wyx^3 + d\sum wy^2x^2 + \sum wy^2x = 0$$

As seguintes definições podem ser feitas:

$$A_1 = \sum wy\sum wx - \sum w\sum wyx$$

$$A_2 = \sum w\sum wx^2 - (\sum wx)^2$$

$$A_3 = \sum w\sum wx^3 - \sum wx^2\sum wx$$

$$A_4 = \sum wyx\sum wx - \sum w\sum wyx^2$$

$$B_1 = \sum wx^2\sum wy - \sum w\sum wyx^2$$

$$B_2 = \sum w\sum wx^4 - (\sum wx^2)^2$$

$$B_3 = \sum wyx\sum wx^2 - \sum w\sum wyx^3$$

$$C_1 = \sum w\sum wy^2x - \sum wy\sum wyx$$

$$C_2 = \sum w\sum wy^2x^2 - (\sum wyx)^2$$

E ainda:

$$P_1 = A_1A_3 - A_2B_1$$

$$P_2 = A_2B_2 - (A_3)^2$$

$$P_3 = A_3A_4 - A_2B_3$$

$$Q_1 = A_1A_4 - A_2C_1$$

$$Q_2 = A_2B_3 - A_3A_4$$

$$Q_3 = (A_4)^2 - A_2C_2$$

As constantes podem ser calculadas pelas seguintes relações:

$$d = \frac{P_2Q_1 - P_1Q_2}{P_3Q_2 - P_2Q_3},$$

$$c = \frac{P_1 + dP_3}{P_2} = \frac{Q_1 + dQ_3}{Q_2},$$

$$b = \frac{-A_1 - cA_3 - dA_4}{A_2}$$

e

$$a = \frac{\sum w y + d \sum w y x - c \sum w x^2 - b \sum w x}{\sum w}$$

VALOR DO F DE SENEDECOR. Se \hat{y} é a estimativa de cada dado experimental y , então a variância não explicada (variância residual) é dada por

$$Vares = \frac{\sum (y - \hat{y})^2}{n - p}$$

onde n é o número de dados experimentais e p o número de constantes da equação de regressão. A variância explicada, por outro lado, é dada por

$$Varex = \frac{\sum (\hat{y} - \bar{y})^2}{p - 1}$$

onde \bar{y} é a média, $\sum y/n$, dos n experimentos. O valor do F de Snedecor pode ser calculado por,

$$F = \frac{Varex}{Vares},$$

o qual deve ser confrontado com o valor de F tabelado para os $v_1 = p - 1$ e $v_2 = n - p$ graus de liberdade.

B I B L I O G R A F I A

1. THUNBERG, T.— The effect of various substances on the gas exchange of frog muscle. IV. The effect of organic acids. *Skand. Arch. Physiol.* 24:23-61, 1910.
2. BATELLI, F. & STERN, L. — Oxidation of malic, fumaric and citric acids by the animal tissues. *Compt.Rend.Soc.Biol.* 69:552-554, 1910.
3. STRAUB, F.B. — Reinigung der Apfelsäuredehydrase und die Bedeutung der Zellstruktur in der Apfelsäure dehydrierung. *Z. Physiol.Chem.* 275:63-72, 1942.
4. OCHOA, S. — Malic dehydrogenase from pig heart. In: COLDWICK, S. P. & KAPLAN, N.P. *Methods in enzymology*. New York, Academic Press, 1955. Vol. 1, p.735-739.
5. WOLFE, R.G. & NEILANDS, J.B. — Some molecular and kinetic properties of heart malic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 221:61-69, 1956.
6. DAVIES, D.D. & KUN, E. — Isolation and properties of malic dehydrogenase from ox-heart mitochondria. *Biochem. J.*, 66:307-316, 1957.
7. ENGLARD, S. & SIEGEL, L. — Beef-heart malic dehydrogenases. I. Properties of the enzyme purified from extracts of acetone-dried powders. *Biochim. Biophys. Acta*, 54:67-76, 1961.
8. ENGLARD, S. & GREIGER, H.H. — Beef-heart malic dehydrogenases. II. Preparation and properties of crystalline supernatant malic dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 56:571-583, 1962.
9. DUPOURQUE, D. & KUN, E. — Cytoplasmic and mitochondrial malate dehydrogenases from beef kidney. In: LOWENSTEIN, J.M., ed. *Methods in enzymology*. New York, Academic Press, 1969. Vol. XIII, p. 116-122.
10. RAVAL, D.N. & WOLFE, R.G. — Malic dehydrogenase. II. Kinetic studies of the reaction mechanism. *Biochemistry*, 1:263-269, 1962.
11. RAVAL, D.N. & WOLFE, R.G. — Malic dehydrogenase. III. Kinetic studies of the reaction mechanism by product inhibition. *Biochemistry*, 1:1112-1117, 1962.
12. RAVAL, D.N. & WOLFE, R.G. — Malic dehydrogenase. IV. pH dependence of the kinetic parameters. *Biochemistry*, 1:1118-1123, 1962.

13. RAVAL, D.N. & WOLFE, R.G. — Malic dehydrogenase. V. Kinetic studies of substrate inhibition by oxaloacetate. *Biochemistry*, 2:220-224, 1963.
14. FRIEDEN, C. & FERNANDEZ-SOUZA, J. — Kinetic studies on pig heart cytoplasmic malate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 250: 2106-2113, 1975.
15. HEYDE, E. & AINSWORTH, S. — Kinetic studies on the mechanism of the malate dehydrogenase reaction. *J. Biol. Chem.*, 243: 2413-2423, 1968.
16. CASSMAN, M. & ENGLARD, S. — Beef-heart malic dehydrogenase. V. A kinetic study of the reaction catalyzed by the supernatant enzyme. *J. Biol. Chem.*, 241:793-799, 1966.
17. PFLEIDERER, G. & HOHNHOLZ, E. — Zum Wirkungsmechanismus von Dehydrogenasen. Über binäre und ternäre symplexe der Äpfelsäuredehydrogenase mit Coenzym, Substrat und Sulfit. *Biochem. Z.*, 331:245-253, 1959.
18. KUN, E.; EANES, R.Z. & WOLFIN, P. — Selective modification of mitochondrial malate dehydrogenase activity by changes in ionic strength. *Nature*, 214:1328-1330, 1967.
19. HEATH, D.F. & PHILLIPS, J.C. — Disequilibrium in the malate dehydrogenase reaction in rat liver mitochondria in vivo. *Biochem. J.* 127:453-470, 1972.
20. DEVENYI, T.; ROGERS, S.J. & WOLFE, R.G. — Structural studies of pig heart malate dehydrogenase. *Nature*, 210:489-491, 1966.
21. COVELLI, I.; CONSIGLIO, E. & VARRONE, S. — Isolation of a mitochondrial 9S protein with malate dehydrogenase activity and its activation by thyroxine in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, 184:678-681, 1969.
22. CONSIGLIO, E.; VARRONE, S. & COVELLI, I. — Characterization of the heavy form (9S) of mitochondrial malate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 17:408-414, 1970.
23. TSERNOGLOU, F.D.; HILL, E. & BANASZAK, L.J. — Structural studies on heart muscle malate dehydrogenases. *Cold Spring-Harbour Symposia on Quant. Biology*, 36:171-178, 1971.
24. CASSMAN, M. & KING, R.C. — Subunit interactions and ligand binding in supernatant malic dehydrogenase. Cooperative binding of reduced nicotinamide adenine dinucleotide associated with a monomer-dimer equilibrium of the protein. *Biochemistry*, 11:4937-4944, 1972.
25. CASSMAN, M. & VETTERLEIN, D. — Allosteric and nonallosteric inter-

- actions with reduced nicotinamide adenine dinucleotide in two forms of cytoplasmic malic dehydrogenase. *Biochemistry*, 13:684-689, 1974.
26. DUPOURQUE, D. & KUN, E. — Malate dehydrogenase of ox kidney. 1. Isolation and properties of the mitochondrial enzyme. *European J. Biochem.* 6:151-155, 1968.
27. CLELAND, W.W. — The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations. *Biochim. Biophys. Acta*, 67:104-137, 1962.
28. CLELAND, W.W. — The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. II. Inhibition: nomenclature and theory. *Biochim. Biophys. Acta*, 67:173-187, 1962.
29. CLELAND, W.W. — The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. III. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection. *Biochim. Biophys. Acta*, 67:188-196, 1962.
30. HORECKER, B.L. & KORNBERG, A. — The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 175:385-390, 1948.
31. CRANE, F.L.; GLENN, J.L. & GREEN, D.E. — Studies on the electron transfer system: the electron transfer particle. *Biochim. Biophys. Acta*, 22:475-487, 1956.
32. LOWRY, O.M.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. — Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
33. GLASSTONE, S. — *Termodinámica para químicos*. 5ª ed., Madrid, Aguilar SA, 1970.
34. MELLOR, J.W. — *Higher mathematics for students of chemistry and physics*. New York, Dover Publications, 1954.
35. CLELAND, W.W. — The statistical analysis of enzyme kinetic data. In: NORD, F.F., ed., *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*. New York, Interscience Publishers, 1967. Vol. 29, p.1-32.
36. WILKINSON, G.N. — Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochem. J.*, 80:324-332, 1961.
37. KING, E.L. & ALTMAN, C. — A schematic method of deriving rate laws for enzyme-catalyzed reactions. *J. Phys. Chem.* 60:1375-1378, 1956. In: PLOWMAN, K.M. *Enzyme kinetics*. New York, McGraw Hill, 1972.
38. FERAUDI, M. — Eine Methode zur ermittlung des möglichen Mechanis-

- mus einer enzymatischen Reaktion aus kinetischen Daten. *Enzymologia*, 37:33-66, 1969.
39. WEBB, J.L. — *Enzyme and metabolic inhibitors*. New York, Academic Press, 1963. Vol. I, p.111-139 e p.815-839.
40. CLELAND, W.W. — Steady-state kinetics. In: BOYER, P.D., ed. *The enzymes*. New York, Academic Press, 1970. Vol. 2, p.1-65.
41. SILVERSTEIN, E. & SULEBELE, G. — Equilibrium kinetic study of the mechanism of mitochondrial and supernatant malate dehydrogenases of bovine heart. *Biochim. Biophys. Acta*, 185:297-304, 1969.
42. HAKALA, M.T.; GLAID, A.J. & SCHWERT, G.W. — Lactic dehydrogenase. II. Variation of kinetic and equilibrium constants with temperature. *J. Biol. Chem.*, 221:191-209, 1956.
43. WRATTEN, C.C. & CLELAND, W.W. — Product inhibition studies on yeast and liver alcohol dehydrogenases. *Biochemistry*, 2:935-941, 1963.
44. WRATTEN, C.C. & CLELAND, W.W. — Kinetic studies with liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry*, 4:2442-2451, 1965.
45. HARADA, K. & WOLFE, R.G. — Malic dehydrogenase. VI. A kinetic study of hydroxymalonate inhibition. *J. Biol. Chem.*, 243:4123-4130, 1968.
46. HARADA, K. & WOLFE, R.G. — Malic dehydrogenase. VII. The catalytic mechanism and possible role of identical protein subunits. *J. Biol. Chem.*, 243:4131-4137, 1968.
47. KIMENEZ, E.S. DE; LEE, E.; TORRES, J. & SOBERON, G. — On the mechanism of the effect of ionic strength on crystalline aldolase activity. *J. Biol. Chem.*, 239:4154-4158, 1964.
48. BRAY, H.G. & WHITE, K. — *Kinetics and thermodynamics in biochemistry*. London, Churchill ltd., 1957. p.204-253.
49. BRONSTED, J.N. & LIVINGSTONE, R. — The velocity of ionic reactions. *J. Amer. Chem. Soc.*, 49:435-446, 1927.
50. DAWES, E.A. — Enzyme kinetics. In: FLORKIN, M. & STOTZ, E., eds. *Comprehensive biochemistry*. Amsterdam, Elsevier, 1964. Vol. 12, p. 89-125.
51. KISTIAKOWSKI, G.B.; MANGELSDORF, P.C.; ROSENBERG, A.J. & SHAW, W. H. R. — The effects of electrolytes on urease activity. *J. Amer. Chem. Soc.*, 74:5015-5020, 1952.
52. MORRIS, G.J. — *Físico-química para biólogos*. São Paulo, Ed. Universidade de São Paulo, 1972.

53. HODGMAN, C.D.; WEAST, R.C. & SELBY, S.M., eds. — *Handbook of chemistry and physics*. Cleveland, The Chemical Rubber Publishing Co., 1960. p.2611.
54. DEBYE, P. & HÜCKEL, E. — Zur Theorie der Elektrolyte. *Physik. Z.*, 9: 185-206, 1923.
55. HÜCKEL, E. — Zur Theorie konzentrierterer wässriger Lösungen starker Elektrolyte. *Physik. Z.*, 26: 93-147, 1925.